



**Matthew Joshua
Azevedo Gonçalves**

**Produção de Biocombustível de 2ª Geração:
Obtenção de Bioetanol a partir de Cardo**



**Matthew Joshua
Azevedo Gonçalves**

**Produção de Biocombustível de 2ª Geração:
Obtenção de Bioetanol a partir de Cardo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Sistemas Energéticos Sustentáveis, realizada sob a orientação científica do Doutor Fernando José Neto da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Mecânica da Universidade de Aveiro, da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Maria Conceição Fernandes, Investigadora principal do Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL).

Dedico este trabalho aos meus pais.

O júri

Presidente

Professor Doutor António Gil D'Orey de Andrade Campos
Professor Auxiliar do Departamento de Mecânica da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Paula Mora Tavares
Estagiária de Pós-Doutoramento do Instituto de Materiais de Aveiro (CICECO) da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Ana Maria Rebelo Xavier
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Agradeço à Professora Ana Xavier toda a tutoria e orientação científica para a realização desta dissertação. Sem o seu auxílio, este trabalho não teria sido possível.

Agradeço à Doutora Maria Conceição, por todo o apoio e orientação ao longo das etapas processuais realizadas no estágio.

Agradeço ao CEBAL – Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-alimentar do Alentejo pela oportunidade e a todos os colegas de lá, por todo o amparo e amizade prestado.

Agradeço à minha namorada Lisandra Sousa por todo o apoio, por toda a ajuda, paciência e, fundamentalmente, por ter estado ao meu lado ao longo desta caminhada.

Agradeço ao meu amigo Miguel Medeiros por todo o apoio e sabedoria transmitida.

Agradeço à Universidade de Aveiro a oportunidade concedida.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão, por toda a preocupação, carinho, disponibilidade, resiliência e por estarem do meu lado, nos bons e maus momentos.

Palavras-chave

Bioetanol, hidrolisado de Cardo, fermentação, *Scheffersomyces stipitis*, *Escherichia coli*.

Resumo

A incorporação de biocombustíveis líquidos, concretamente bioetanol, no setor dos transportes é um objetivo obrigatório com metas mínimas de incorporação definidas na União Europeia. Neste sentido, é reiterada a importância de garantir disponibilidade comercial dos biocombustíveis de 2ª geração, derivado das perturbações económicas e sociais originadas pela produção de biocombustíveis de 1º geração, produzidos a partir de matéria-prima alimentar e com consequências nefastas sobre as cadeias alimentares. Assim urge encontrar-se alternativas que passam pela utilização de matérias-primas lenhocelulósicas baratas, como é o caso do cardo. O objetivo deste trabalho é estudar a produção de bioetanol a partir de hidrolisados originados partindo do cardo. Estes hidrolisados são ricos em monossacáridos fermentáveis, nomeadamente em xilose, para conversão a bioetanol de 2º geração. Para além disso, apresentam também inibidores que requerem a sua remoção. Estudou-se o método de destoxificação com carvão ativado e comparou-se com um hidrolisado filtrado por membranas de nanofiltração. Utilizaram-se a levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS5773 e a bactéria modificada *Escherichia coli* MSO4 para fermentação dos açúcares a bioetanol em diferentes condições experimentais.

Realizaram-se quatro tipologias de ensaios em duplicado, ou seja, a partir de meio sintético LB ou YMP, de hidrolisado destoxificado com carvão ativado, de hidrolisado destoxificado por membranas e de hidrolisado não destoxificado. Os melhores resultados foram obtidos com a *E. coli* no ensaio com hidrolisado destoxificado por membranas, no qual se obteve uma taxa volumétrica de produção de etanol de 0,28 g/L.h, um rendimento em etanol de 0,45 g/g e uma eficiência de fermentação de 88,1%. No que concerne à *S.stipitis*, o hidrolisado destoxificado por membranas apresentou a taxa volumétrica de produção de etanol de 0,08 g/L.h, um rendimento em etanol de 0,28 g/g e uma eficiência de fermentação de 54,7%. Os resultados apresentados, permitem concluir que a produção de etanol a partir de hidrolisados de cardo, destoxificados com recurso a nanofiltração com membranas, apresenta uma alternativa muito promissora na produção de bioetanol de 2º geração, principalmente utilizando a *E. coli* modificada.

Keywords

Bioethanol, cardoon hidrolized, fermentation, *Scheffersomyces stipitis*, *Escherichia coli*.

Abstract

The liquid biofuels incorporation in the transportation sector, particularly bioethanol, has been legislated by the European Union as a step to the energy efficiency. Additionally, It is important to guarantee the biofuels commercial availability in order to tackle the socioeconomic challenges that come from the continued use of fossil fuels.

However, it is important to ensure that these biofuels should be second generation, since the first generation biofuels mainly rely on food raw materials which could directly impact the food supply chain. Therefore, there is a need to find alternatives, which use cheap lignocellulosic raw materials such as cardoon. It is the purpose of this work to study the production of bioethanol from hydrolysates originated from cardoon.

These hydrolysates are rich in fermentable monosaccharides such as xylose which are important for the conversion of second generation bioethanol. Moreover, they also contain inhibitors which require their removal. In this work, the approached adopted used hydrolysate detoxification with activated coal and compared with a filtered hydrolyzate through nanofiltration membranes. The *Scheffersomyces stipitis* CBS5773 yeast was used as well as the modified *Escherichia coli* MSO4 bacteria for the sugars fermentation in different experimental conditions.

Four trials were performed, through the synthetic medium LB or YMP of detoxified hydrolyzate with coal activated; of detoxified hydrolyzate with membranes and non-detoxified hydrolyzate. The promising results of this study came from the use of *E. coli* through *cardoon* hydrolyzates in the trials of detoxified hydrolyzate with membranes which obtained an ethanol volumetric production of 0,28 g/L.h an ethanol efficiency of 0,45 g/g and a fermentation efficiency of 88,1%. Regarding the *S.stipitis*, the trial of detoxified hydrolysate obtained an ethanol volumetric production rate of 0,08 g/L.h an ethanol efficiency of 0,28 g/g and a fermentation efficiency of 54,7%.

Based on these results, it can be concluded that the production of ethanol through cardoon hydrolyzate (detoxified with the use of nanofiltration with membranes), presents a suitable alternative for the production of second generation of bioethanol, especially with the use of the modified *E. coli*.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Âmbito do Trabalho e Enquadramento | 4 |
| 1.2. Motivação e Objetivos | 4 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 2.1. Bioenergia – biocombustíveis | 7 |
| 2.2. Os materiais lenhocelulósicos | 13 |
| 2.3. <i>Cynara cardunculus</i> – Características e composição química | 18 |
| 2.4. Pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos | 24 |
| 2.5. Processo de destoxificação | 31 |
| 2.6. Produção de etanol lenhocelulósico | 35 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 3.1. <i>Cynara cardunculus</i> | 43 |
| 3.2. Preparação de hidrolisado de cardo | 43 |
| 3.3. Destoxificação dos hidrolisados | 44 |
| 3.4. Microrganismos | 46 |
| 3.5. Meios de cultura | 47 |
| 3.6. Preparação dos inóculos | 48 |
| 3.7. Métodos analíticos | 48 |
| 3.8. Parâmetros cinéticos e estequiométricos | 52 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 4.1. Composição do hidrolisado do pré-tratamento | 55 |
| 4.2. Efeito dos processos de destoxificação na composição dos hidrolisados | 56 |
| 4.3. Fermentações | 59 |
| 4.3.1. Ensaio em Erlenmeyer com <i>Escherichia coli</i> | 59 |
| 4.3.2. Ensaio em Erlenmeyer com <i>Scheffersomyces stipitis</i> | 69 |
| 4.4. Comparação dos parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos nas fermentações | 76 |
| 5. CONCLUSÃO | 79 |
| 6. TRABALHO FUTURO | 81 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 83 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Propriedades da gasolina e do etanol [adaptado de Junior, 2008]..... | 8 |
| Tabela 2 - Consumo de etanol e biodiesel no setor dos transportes, por região, e respetiva projeção futura (milhões de barris de equivalente em petróleo por dia) (mboe/d) [adaptado de (WEO, 2013)]. | 10 |
| Tabela 3 - Preço estimado dos biocombustíveis quanto comparado com o preço do petróleo (biocombustíveis isentos de impostos) (US centavos/litro) (Demirbas, 2011) | 13 |
| Tabela 4 - Composição química do Cardo em % de matéria-seca [adaptado de (Ballesteros <i>et al.</i> , (2008); Cotana <i>et al.</i> , (2015); Fernandes <i>et al.</i> , 2015)] | 19 |
| Tabela 5 - Comparação das etapas aplicadas ao bioprocessamento do cardo na produção de etanol..... | 23 |
| Tabela 6 - Comparação de processos de fracionamento seletivo das hemiceluloses de materiais lenhocelulósicos adaptado de (Gírio <i>et al.</i> , 2010)] | 31 |
| Tabela 7 - Composição do hidrolisado de cardo após o pré-tratamento - concentração de açúcares na forma monomérica e inibidores | 55 |
| Tabela 8 Composição dos monossacáridos e inibidores presentes nos hidrolisados - não destoxificados e destoxificados com carvão ativado..... | 57 |
| Tabela 9 - Composição dos monossacáridos e inibidores presentes nos hidrolisados - não destoxificado e destoxificado por membranas. | 58 |
| Tabela 10 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos com o meio sintético LB..... | 62 |
| Tabela 11- Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos com o hidrolisado destoxificado por membranas..... | 67 |
| Tabela 12 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos com o meio sintético YMP | 72 |
| Tabela 13 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos com o hidrolisado destoxificado por membranas..... | 75 |
| Tabela 14 - Principais parâmetros de produção de etanol obtidos nas diferentes fermentações | 77 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Evolução da incorporação de biocombustíveis no sector dos transportes (EEA, 2009)..... | 3 |
| Figura 2 - Produção mundial de etanol e biodiesel (REN21, 2012)..... | 9 |
| Figura 3 - Classificação dos biocombustíveis [adaptado de Nigam, 2011]..... | 11 |
| Figura 4 - Esquema geral dos componente químicos da madeira [adaptado de Fengel,1983]..... | 15 |
| Figura 5 - Representação esquemática simples da estrutura da celulose (Sjostrom, 1993) | 16 |
| Figura 6 - Diagrama processual de produção de etanol a partir do Cardo. | 22 |
| Figura 7 - Estrutura esquemática do efeito da etapa de pré-tratamento em materiais lenhocelulósicos [adaptado de Balat, 2011] | 24 |
| Figura 8 - Hidrolisados obtidos para as fermentações em Erlenmeyer | 51 |
| Figura 9 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, ácido acético, biomassa e perfil do pH ao longo do tempo de fermentação..... | 61 |
| Figura 10 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, ácido acético e perfil de pH ao longo do tempo da fermentação..... | 64 |
| Figura 11 - Concentração de etanol, arabinose, glucose, ácido acético e perfil de pH ao longo do tempo de fermentação..... | 66 |
| Figura 12 - Concenração de etanol, arabinose, glucose, ácido acético, biomassa e perfil de pH ao longo do tempo de fermentação..... | 69 |
| Figura 13 - Concentração de etanol, xilose, glucose, biomassa e perfil do pH ao longo do tempo de fermentação..... | 71 |
| Figura 14 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, biomassa e perfil de pH ao longo da fermentação..... | 73 |
| Figura 15 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, biomassa e perfil de pH ao longo do tempo de fermentação..... | 74 |
| Figura 16 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, biomassa e perfil de pH ao longo do tempo de fermentação..... | 76 |

1. INTRODUÇÃO

Num mundo em constante crescimento mecanizado, as exigências energéticas são proporcionalmente repercutidas ao longo do tempo. Assim, o petróleo é a principal força-motriz da economia global, sendo o combustível fóssil com maior preponderância na definição das políticas económicas dos países industrializados. Nos anos 70, impulsionada pelos choques petrolíferos 1973 e 1979 e consequente aumento do preço do petróleo, assistiu-se a uma divulgação, incentivo e procura mais acentuada de fontes alternativas de energia, para que os países embargados pudessem ter, não só uma maior independência energética como também uma maior segurança no seu aprovisionamento energético (Figueroa, 2013).

Apesar destes esforços na divulgação e procura de novas fontes energéticas a realidade tem sido bastante distinta, isto é, o consumo mundial de petróleo entre 1973 e 2006, aumentou de 58 milhões de barris por dia, para uns impressionantes 85 (World Energy Outlook, 2013).

Como tal, urge a necessidade de se mudar o paradigma na produção e consumo de energia primária, inerente à insegurança do aprovisionamento energético constante, provocado pela instabilidade política dos membros da OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo), principalmente os países do Médio Oriente, e consequentes oscilações dos preços dos combustíveis fósseis, ao esgotamento vertiginoso dos mesmos e à necessidade legal de se reduzir as emissões de gases com efeito de estufa.

Para este consumo exacerbado dos combustíveis fósseis, perspectiva-se a curto prazo a depleção dos mesmos e para o qual em muito contribui o sector dos transportes, visto tratar-se de um grande consumidor de energia fóssil. Somente na União Europeia, cerca de um terço da energia final é consumida neste sector, sendo que grande parte desta, sensivelmente 72%, tem como fonte externa o petróleo. O sector dos transportes tem igualmente um peso importante no que a GEE (emissões de gases com efeito de estufa) diz respeito, sendo o segundo maior emissor na União Europeia com 19% das emissões e superado única e exclusivamente pelo sector industrial (31%) (Mahieu, 2009).

Assim, fica patente a dimensão e importância do sector dos transportes no que concerne ao consumo de energia bem como os GEE por ele emanado, sendo assim crucial uma intervenção reformuladora neste sector com o intuito de sustentar, parcialmente, o seu consumo através de fontes alternativas como os biocombustíveis, de mitigar o nível de emissões de CO₂ (dióxido de carbono) e de outros gases com efeito de estufa, de diversificar a origem de energia primária bem como de reduzir a dependência energética externa em relação aos produtos petrolíferos.

Neste sentido, a Comissão Europeia começou, primeiramente, por implementar a Diretiva 2003/30/CE, relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes. Esta definia uma quota, em teor energético, de 5,75% de substituição da gasolina e do gasóleo por biocombustíveis até 2010.

Posteriormente, a Diretiva 2009/28/CE relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis, alterou e revogou a Diretiva supracitada aprovando um objetivo obrigatório mínimo de 10% a alcançar por todos os Estados-Membros para a quota de energias renováveis no consumo de gasolina e gasóleo pelo sector dos transportes até 2020, sendo reiterada a importância de garantir a disponibilidade comercial dos biocombustíveis de segunda geração.

Na figura 1, podemos visualizar a meta de incorporação de biocombustíveis no sector dos transportes por parte da União Europeia bem como a nível mundial, onde, neste último cenário, se perspetiva um aumento até aos 6% para o biodiesel e aos 8% para bioetanol para o sector rodoviário até 2020 (EEA, 2009).

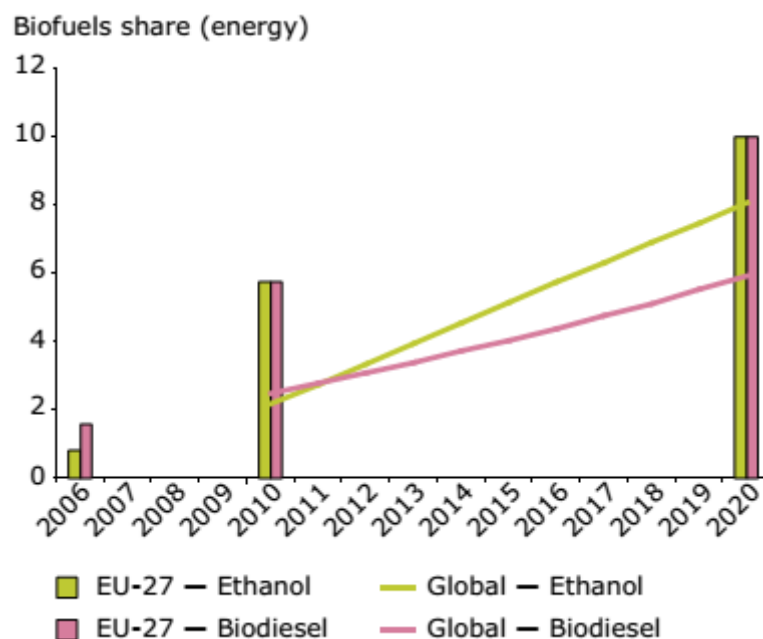


Figura 1- Evolução da incorporação de biocombustíveis no sector dos transportes (EEA, 2009).

Os biocombustíveis líquidos, como podemos constatar, irão assumir uma maior predominância no sector dos transportes no decorrer da próxima década. Para que tal aconteça, é necessário definir-se critérios de sustentabilidade e de desenvolvimento, tendo em consideração o possível impacto da produção de biocombustíveis nos produtos agroalimentares, ou seja, os biocombustíveis de primeira geração.

Assim, deverão centralizar-se esforços na produção de biocombustíveis líquidos de segunda geração, cuja matéria-prima não compita com matéria-prima alimentar prejudicando as cadeias alimentares e provocando desequilíbrios e perturbações sociais. É neste contexto que surge o estudo realizado na presente dissertação, cujo objetivo passa por utilizar os resíduos agroflorestais como fonte de biomassa lenhocelulósica e como potencial matéria-prima para a produção de bioetanol.

Os materiais lenhocelulósicos são essencialmente constituídos por celulose, hemicelulose e lenhina, formando uma macroestrutura complexa e compacta. Como estes materiais possuem uma natureza recalcitrante, que reduz a acessibilidade das enzimas hidrolíticas aos hidratos de carbono no processo de bioconversão, estes devem ser submetidos a um pré-tratamento por forma a proporcionar uma maior acessibilidade

à celulose e hemicelulose, através da remoção de barreiras estruturais e composicionais, permitindo assim aumentar o rendimento de açúcares fermentáveis (Li *et al.*, 2010).

A transformação destes materiais lenhocelulósicos em etanol geralmente é constituída por quatro etapas: o pré-tratamento, a hidrólise enzimática, a fermentação e a separação/purificação do produto final (Li *et al.*, 2010).

1.1. Âmbito do Trabalho e Enquadramento

A presente dissertação foi realizada no Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo, comumente designado de CEBAL, em virtude da parceria existente entre este Centro de Investigação e a Universidade de Aveiro. O CEBAL é uma instituição privada, sem fins lucrativos, sediada na cidade de Beja e que dedica a sua atividade à investigação científica, à transferência de tecnologias e à prestação de serviços específicos.

O trabalho laboratorial da presente dissertação foi desenvolvido no grupo de Engenharia de Processos, sob a orientação da, investigadora principal, Doutora Maria Conceição Fernandes e coorientação da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier.

Esta dissertação surge no âmbito do projecto Bioecos, projecto este enquadrado na rede ECOS – Energia e Construção Sustentáveis, o qual incide sobre a valorização de biomassa vegetal como fonte produtora de energia. Neste caso em particular, ter-se-á em consideração a espécie lenhocelulósica *Cyanara cardunculus*, como matéria-prima em estudo para a produção de etanol a partir do seu hidrolisado (fração líquida) gerado após aplicação do pré-tratamento.

1.2. Motivação e Objetivos

Esta dissertação enquadra-se numa temática que está na ordem do dia, na medida em que, como referido anteriormente, urge a necessidade legal de se incorporar biocombustíveis nos transportes devido aos diversos fatores supracitados.

O objetivo primordial da presente dissertação foi estudar a produção de bioetanol a partir de recursos agroflorestais, concretamente a partir de resíduos da espécie *Cyanara cardunculus* (cardo).

Os objetivos específicos foram:

- Determinar a composição da fração líquida (hidrolisado) obtida após o pré-tratamento do cardo;
- Aplicar dois processos de destoxificação à referida fração líquida;
- Comparar os dois processos destoxificantes aplicados e a sua influência na etapa fermentativa;
- Comparar a produção de etanol por uma bactéria modificada e por uma levedura;
- Definir o melhor método destoxificante e microrganismo no rendimento de etanol obtido a partir do cardo.

Para o cumprimento destes objetivos, primeiro foi aplicado um pré-tratamento de hidrólise ácida diluída ao cardo, gerando-se o hidrolisado proveniente da fração líquida. Depois foram aplicados ao hidrolisado, dois métodos de destoxificação diferentes (com carvão ativado e com membranas), concentrando-os posteriormente por evaporação sob vácuo. Por último foram realizadas fermentações com dois microrganismos diferentes, utilizando-se os respetivos hidrolisados para a produção de etanol, avaliando-se seguidamente o melhor método e microrganismo fermentativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioenergia – biocombustíveis

A bioenergia, numa aceção razoavelmente rigorosa, pode ser definida como toda e qualquer forma de energia associada a formas de energia química acumulada mediante processos fotossintéticos. Assim, os recursos naturais que dispõem de fontes de bioenergia e que podem ser processados para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas como produto final, designam-se biomassa (Junior *et al.* 2008).

2.1.1. O Bioetanol como biocombustível

De acordo com a diretiva 2003/30/CE, o termo bioetanol é definido como o “etanol produzido a partir da biomassa, e/ou da fração biodegradável de resíduos, para a utilização como biocombustíveis”.

O etanol, também conhecido como álcool etílico, é um líquido inflamável, volátil, incolor e totalmente solúvel em água. A sua forma molecular é C_2H_5OH , contendo, aproximadamente, 52% em massa de carbono, 13% em massa de hidrogénio e 35% em massa de oxigénio na sua composição, o que reduz a emissão de partículas e de óxidos de azoto (NOx) aquando a sua queima, permitindo uma combustão mais limpa do que a queima da gasolina (Larsen *et al.* 2009).

Quando comparado com a gasolina, como pode-se ver na tabela 1, o bioetanol tem um índice de octanas superior, limites de inflamabilidade mais amplos, velocidade de chama mais elevada e maior calor de vaporização. Estas propriedades permitem uma taxa de compressão mais elevada, tempos de combustão mais curtos, resultando assim em uma maior eficiência. As suas desvantagens incluem uma densidade energética inferior à da gasolina, a corrosibilidade, a dificuldade no arranque a frio devido à sua baixa pressão de vapor, a miscibilidade com a água, a sua volatilidade e alguma toxicidade para os ecossistemas (Larsen *et al.* 2009).

O bioetanol pode ser utilizado em motores especificamente preparados para o efeito, ou ser adicionado a gasolina para formar uma mistura E10 (10% de bioetanol e 90% de

gasolina convencional). Este pode também ser utilizado em concentrações mais elevadas. Para que tal seja possível, alguns fabricantes de automóveis produzem veículos flexíveis quanto ao tipo de mistura (flex fuel vehicles), que podem operar com a adição de bioetanol até 85% (E85) (Larsen *et al.* 2009).

Tabela 1 - Propriedades da gasolina e do etanol [adaptado de (Junior, 2008)]

| <i>Parâmetro</i> | <i>Gasolina</i> | <i>Etanol</i> | <i>Unidade</i> |
|---|-----------------|---------------|----------------|
| <i>Poder Calorífico Inferior</i> | 43.500 | 28.225 | Kj/kg |
| <i>Densidade</i> | 32.180 | 22.350 | Kj/litro |
| <i>Octanagem RON (Research Octane Number)</i> | 0,72 - 0,78 | 0,792 | Kg/litro |
| <i>Octanagem MON (Motor Octane Number)</i> | 90 - 100 | 102 - 130 | |
| <i>Calor latente de vaporização</i> | 80 - 92 | 89 - 96 | |
| <i>Relação ar/combustível estequiométrico</i> | 330 - 400 | 842 - 930 | Kg/litro |
| <i>Pressão de vapor</i> | 14,5 | 9 | |
| <i>Solubilidade em água</i> | 40 - 65 | 15 - 17 | Kpa |
| <i>Temperatura de ignição</i> | 0 | 100 | % em volume |
| <i>Peso Molecular</i> | 220 | 420 | °C |
| | 111 | 46 | Kg/Kmol |

2.1.2. Produção de biocombustíveis: Consumo e perspectivas futuras

Os biocombustíveis líquidos, nomeadamente o etanol e o biodiesel, têm tido um crescimento produtivo a nível mundial. No entanto o seu impacto no setor rodoviário ainda é relativamente reduzido tendo assim uma contribuição pequena, mas crescente, no seu uso como combustível.

Na figura 2, é visível a evolução do crescimento produtivo de etanol e biodiesel a nível mundial. Assim, no início do milénio, a produção conjunta dos mesmos, situava-se em torno dos 17,8 bilhões de litros tendo a mesma tido um crescimento conjunto para valores na ordem dos 107,5 bilhões de litros no ano de 2011. Pode-se também observar que o etanol é, claramente, o biocombustível produzido em maior escala tendo-se verificado, no entanto, um ligeiro decréscimo produtivo no ano de 2011. Por seu lado, a produção de biodiesel teve um crescimento ininterrupto, no período considerado (REN21, 2012).

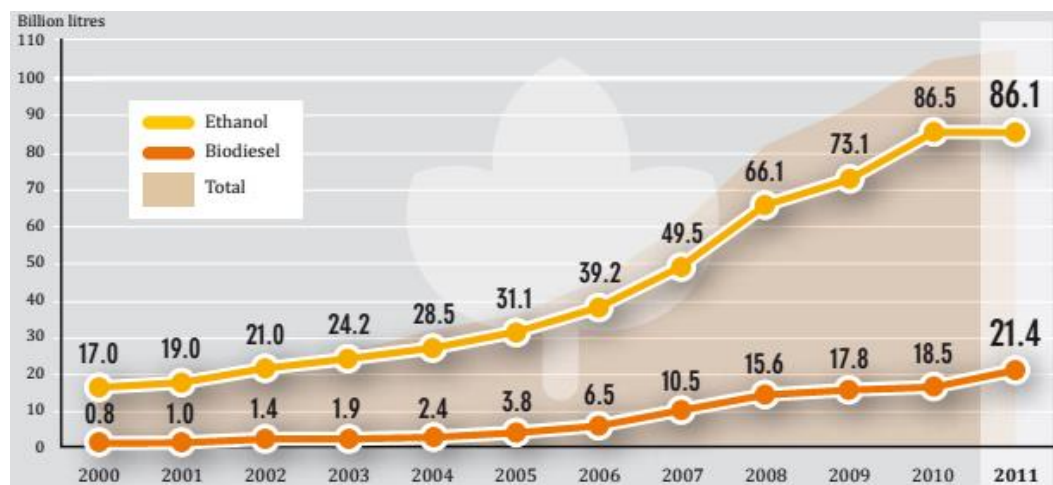


Figura 2 - Produção mundial de etanol e biodiesel (REN21, 2012).

Com recurso à tabela 2, tem-se uma maior ilação sobre o impacte da produção destes biocombustíveis no setor rodoviário. Assim sendo, visualiza-se que a produção conjunta de etanol e biodiesel no ano de 2011 foi responsável sensivelmente 3% do consumo mundial de combustível (em uma base energética) no referido (World Energy Outlook, 2013).

A projeção, segundo a Agência Internacional de Energia (AIE), é a de que o consumo de biocombustíveis aumente de 1,3 milhões de barris de equivalente em petróleo por dia (mboe/d) em 2011 para 2,1 mboe/d em 2020 e para 4,1 mboe/d em 2035 (Ningam, P. e Slingh, A., 2011). Assim é de se esperar que os biocombustíveis, em 2035, satisfaçam 8% da procura de combustível por parte do setor dos transportes rodoviários a nível global (World Energy Outlook, 2013).

Outra conclusão a partir da tabela 2 é que o etanol quer em 2011, quer numa perspetiva de longo prazo (2035), abrange sensivelmente 70% dos biocombustíveis globais, sendo estimado que o valor nominal produtivo de etanol triplique entre o período supracitado.

Para este mesmo período, os Estados Unidos, Brasil, a Europa, China e Índia serão responsáveis por 90% da produção de biocombustíveis, sendo estes valores

impulsionados pelas políticas governamentais favoráveis que permitem uma expansão do mercado bioenergético. Ao longo do mesmo período da projeção, o setor da aviação também irá ganhar o seu espaço no que à utilização de biocombustíveis diz respeito (World Energy Outlook, 2013).

Tabela 2 - Consumo de etanol e biodiesel no setor dos transportes e respetiva projeção futura (milhões de barris de equivalente em petróleo por dia) [adaptado de (World Energy Outlook, 2013)].

| | <i>Etanol</i> | | <i>Biodiesel</i> | | <i>Total de biocombustíveis</i> | | <i>Percentual da energia usada no setor dos transportes</i> | |
|-----------------------|---------------|------|------------------|------|---------------------------------|------|---|------|
| | 2011 | 2035 | 2011 | 2035 | 2011 | 2035 | 2011 | 2035 |
| OCDE | 0.7 | 1.5 | 0.2 | 0.8 | 0.9 | 2.3 | 4% | 12% |
| América | 0.6 | 1.3 | 0.1 | 0.3 | 0.7 | 1.6 | 4% | 13% |
| EUA | 0.6 | 1.2 | 0.1 | 0.3 | 0.7 | 1.5 | 5% | 15% |
| Europa | 0.0 | 0.2 | 0.2 | 0.5 | 0.2 | 0.7 | 4% | 12% |
| Ásia | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.8 | 1% | 4% |
| China | 0.0 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 1% | 4% |
| Índia | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0% | 4% |
| América Latina | 0.3 | 0.8 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 1.0 | 10% | 20% |
| Brasil | 0.2 | 0.6 | 0.0 | 0.2 | 0.3 | 0.8 | 19% | 30% |
| Mundo | 1.0 | 2.9 | 0.4 | 1.1 | 1.3 | 4.1 | 3% | 8% |

2.1.3. Os biocombustíveis: Classificação

Os biocombustíveis são descritos como líquidos, gasosos ou sólidos, produzidos predominantemente a partir de biomassa, sendo possível produzir-se a partir desta, uma variedade de combustíveis como o etanol, o biodiesel, o metanol, diesel Fischer-Tropsch, hidrogénio e metano (Nigam, P. e Slingh, A., 2011).

Estes são classificados, abrangentemente, como primários ou secundários. Nos biocombustíveis primários, há uma utilização sem qualquer tipo de processamento, ou seja, materiais como pellets, lenha e aparas de madeira, permanecem inalterados aquando da sua utilização, por norma para aquecimento e produção de eletricidade (Nigam, P. e Slingh, A., 2011).

No que concerne aos biocombustíveis secundários, estes são produzidos através do processamento da biomassa, sendo os principais exemplos o bioetanol e o biodiesel, sendo essencialmente utilizados como combustível para veículos e em vários processos industriais (Nigam, P. e Slingh, A., 2011). Os biocombustíveis secundários são ainda divididos em primeira, segunda e terceira geração, como podemos visualizar na figura 3, consoante o tipo de matéria-prima e a tecnologia aplicada para a sua produção (Nigam, P. e Slingh, A., 2011).

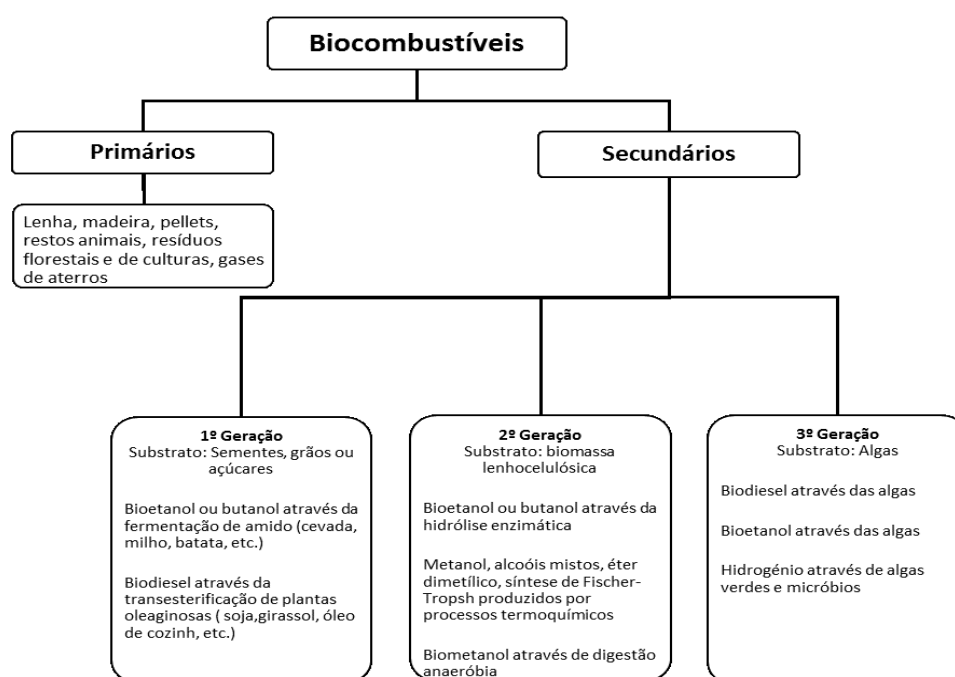


Figura 3 - Classificação dos biocombustíveis [adaptado de Nigam, P. e Slingh, A. 2011]

Em síntese, os biocombustíveis de primeira geração apesar de comercialmente terem um preço relativamente competitivo face ao petróleo, (como se poderá ver adiante na tabela 3) são considerados insustentáveis devido ao conflito existente com as fontes de matéria-prima e os respetivos lugares de cultivo, isto é, a utilização indevida de terrenos aráveis para culturas energéticas ao invés de o ser para alimentação humana/animal, provocando consequentemente uma enorme pressão sobre os mercados alimentares mundiais, afetando sobretudo os países subdesenvolvidos, contribuindo para a escassez de água e precipitando a destruição global de florestas (Demirbas, 2011).

Os biocombustíveis de segunda geração, contrariamente aos de primeira, são produzidos a partir de matérias-primas não comestíveis, ou seja, a partir de biomassa lenhocelulósica, sendo utilizado a parte lenhosa das plantas que não são comestíveis nem competem com a produção de alimentos (Dragone *et al.*, 2010). As fontes incluem resíduos agrícolas, resíduos de exploração florestal, desperdícios de processamento de madeiras, como folhas, palhas e aparas de madeira bem como as componentes não utilizadas ao nível de alimentação da cana-de-açúcar e do milho. Assim, a utilização deste tipo de fontes de biomassa lenhocelulósica permite um reaproveitamento de resíduos e restos de madeira, produzindo-se produtos de valor acrescentado que, à partida, seriam considerados desperdício.

No entanto, a produção de biocombustíveis de segunda-geração requer equipamentos sofisticados e dispendiosos que envolve um pré-tratamento e utilização de enzimas específicas, resultando assim no encarecimento dos bioprodutos e inviabilizando economicamente a sua produção em grande escala (Dragone *et al.*, 2010). Em virtude disto, é necessário continuar a investigar-se formas de otimizar as tecnologias de conversão bem como de produção de matérias-primas, para além de ser necessário um maior investimento por unidade de produção e instalações de maior dimensão, por forma a promover-se uma economia de escala no que à produção diz respeito (Nigam, P. e Slingh, A., 2011).

Assim, os biocombustíveis de terceira-geração, à base de microalgas, são considerados uma fonte energética alternativa viável pois estão desprovidos das principais desvantagens associadas aos combustíveis de primeira e segunda geração (Dragone *et al.*, 2010). As microalgas são capazes de produzir 15-300 vezes mais óleo para a produção de biodiesel do que as culturas tradicionais, tendo também como grande vantagem o fato de terem um período de colheita muito curto (entre 1 a 10 dias, consoante o processo), permitindo assim colheitas contínuas e consequente aumento produtivo, em antítese à colheita das plantas convencionais que se dão entre uma a duas vezes por ano (Dragone *et al.*, 2010). A conversão da biomassa de microalgas para bioetanol dá-se por conversão bioquímica.

2.1.4. O custo dos biocombustíveis

Os custos de produção de biocombustíveis podem variar consoante o tipo de matéria-prima utilizada, o processo de conversão, a escala de produção e a região onde são produzidos, sendo o custo da matéria-prima um dos principais componentes do custo total (Demirbas, 2011). O custo global deve abranger uma outra componente que se trata do impacto deste no mercado relacionado, como o alimentar, em particular o custo de produção de biodiesel a partir de óleo de sementes (Demirbas, 2011).

A tabela 3 mostra-nos o custo dos biocombustíveis, em 2006, quando comparado com os produtos petrolíferos bem como a respetiva estimativa de custos a longo prazo.

Tabela 3 - Preço estimado dos biocombustíveis quanto comparado com o preço do petróleo (biocombustíveis isentos de impostos) (US cents/litro) (Demirbas, 2011)

| <i>Biocombustível</i> | <i>2006</i> | <i>2030</i> |
|--------------------------------------|-------------|-------------|
| Produtos petrolíferos (sem impostos) | 35-60 | |
| Bioetanol de cana-de-açúcar | 25-50 | 25-35 |
| Bioetanol de milho | 60-80 | 35-55 |
| Bioetanol de beterraba | 60-80 | 40-60 |
| Bioetanol de trigo | 70-95 | 45-65 |
| Bioetanol de lenhocelulósicos | 80-110 | 25-65 |
| Biodiesel de gorduras animais | 40-55 | 40-50 |
| Biodiesel de óleos vegetais | 70-110 | 40-75 |
| Síntese líquida de Fischer-Tropsch | 90-110 | 70-85 |

2.2. Os materiais lenhocelulósicos

Os materiais lenhocelulósicos constituem, mundialmente, a principal fonte renovável de produção de bioetanol, sendo capazes de produzir mais de 442 bilhões de litros anualmente (Limayem e Ricke, 2012; Balat *et al.*, 2008).

O denominador comum aos diferentes tipos de biomassa vegetal que compõe os materiais lenhocelulósicos é o fato de serem principalmente constituídos por

polissacáridos (celulose e hemiceluloses) e lenhina formando uma macroestrutura complexa e compacta (Li *et al.*, 2010; Balat *et al.*, 2008).

A biomassa lenhocelulósica apresenta, contudo, diferentes fontes de matéria-prima que, são diferenciadas consoante a sua origem, composição química e estrutura física e mecânica (Limayem e Ricke, 2012).

Tendo por base a premissa origem, os resíduos e subprodutos lenhocelulósicos podem ser subdivididos em quatro categorias: florestais (gerados nas florestas, os provenientes de indústrias papeleras e de transformação de madeiras, como as aparas e serraduras) agrícolas (cascas, palhas, podas de árvores de fruto e videiras, caules e espigas de cereais) agroindustriais (bagaço de azeitona extratado, dreche cervejeira, casca e sementes de frutos e vegetais) e urbanos (papéis, cartões e lixo doméstico) (Limayem e Ricke, 2012; Balat, 2008; Duarte *et al.*, 2007).

Por sua vez, considerando a sua composição química e respetivas características físicas e mecânicas, os lenhocelulósicos podem ser classificados em materiais lenhosos, de origem folhosa ou resinosa e em materiais não lenhosos, como os materiais herbáceos (materiais agrícolas) como por exemplo o cardo (Limayem e Ricke, 2012).

2.2.1. Estrutura geral da madeira

A madeira pode ser definida como um compósito fibroso, composto por polímeros naturais. Esta natureza polimérica da madeira confere-lhe uma estrutura biológica complexa, constituída por diferentes produtos químicos e células que sinergicamente atuam para atender às necessidades da planta (Dinwoodie, 1989).

Do ponto de vista anatómico, a madeira é um tecido perene, que resulta do crescimento secundário do tronco, ramos e raízes quer de árvores como também de arbustos (Fengel e Wegener, 1983).

Assim, torna-se perceptível que em qualquer processo complexo de bioconversão a composição química da matéria-prima lenhocelulósica bem como a sua estrutura, são variáveis fundamentais que importam definir-se antes de ser efetuado as etapas inerentes

ao processo produtivo. Como tal, proceder-se-á seguidamente a uma análise incidente na estrutura e composição química de madeira.

2.2.2. Composição química da madeira

As madeiras, apesar de poderem ser diferenciadas na sua morfologia fibrosa bem como na sua composição química, têm em comum os principais componentes macromoleculares que constituem a sua parede celular, nomeadamente: os polissacáridos celulose, hemiceluloses e ainda o biopolímero lenhina, sendo os polissacáridos responsáveis por 65 – 75% da massa da mesma. As proporções e composição química das hemiceluloses e lenhina diferem entre as árvores Gimnospérmicas e Angiospérmicas, enquanto a celulose é um componente uniforme de toda a tipologia de madeira (Fengel e Wegener, 1983).

Para além destes constituintes há ainda componentes de baixo peso molecular que estão mais relacionados com as espécies de madeiras específicas nomeadamente em relação ao género e à quantidade (Fengel e Wegener, 1983).

Na figura 4 estão representados os componentes químicos que compõe a madeira.

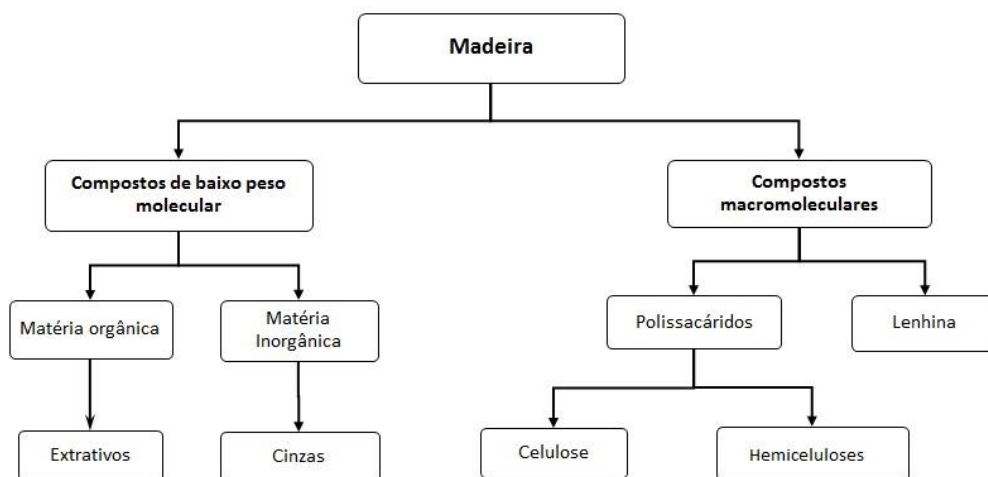


Figura 4 - Representação dos componentes químicos da madeira [adaptado de Fengel e Wegener, 1983]

2.2.2.1. Celulose

A celulose é o componente maioritário dos materiais lenhocelulósicos, sendo responsável por 40 – 50% da massa total seca da maioria das espécies arbóreas (Sjostrom, 1993). É um homopolímero linear de cadeia longa, formado por unidades β -D-glucose na configuração de piranose, ou seja, β -D-glucopiranosose que se encontram unidos por ligações glicosídicas β - (1,4) (figura 5), constituindo o dímero celobiose, que se repete ao longo da cadeia da celulose (Lewin, 1991).

A celulose da madeira é constituída, sensivelmente, por 5000-6000 moléculas de glucose (Xavier *et al.*, 2010). Estas possuem uma tendência a formar ligações de hidrogénio intra e intermoleculares que pré-determinam a sua estrutura fibrilar (Sjostrom, 1993). As moléculas de celulose estão agregadas na forma de microfibrilas, nas quais, regiões altamente ordenadas (cristalinas) alternam com regiões de menor índice de ordenamento, as regiões amorfas (Sjostrom, 1993). A estrutura fibrilar da celulose, originada a partir da acumulação de fibrilas elementares (microfibrilas), constitui o esqueleto da célula que se encontra embebido na matriz de lenhina (Xavier *et al.*, 2010).

Devido a esta estrutura fibrosa bem como às fortes ligações de hidrogénio existentes, torna-se difícil provocar a rutura da celulose, sendo assim insolúvel à maioria dos solventes e dificultando simultaneamente a hidrólise enzimática da mesma (Sjostrom, 1993).

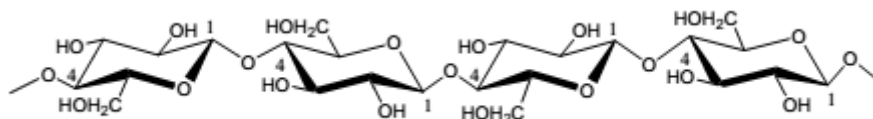


Figura 5 - Representação esquemática simples da estrutura da celulose (Sjostrom, 1993)

2.2.2.2. Hemiceluloses

Contrariamente à celulose, as hemiceluloses são polissacarídeos heterógenos, isto é, são formados a partir da polimerização de diferentes monossacáridos e compreendem entre 100 e 200 unidades monoméricas de açúcar (Lewin, 1991).

Apesar desta diferenciação na constituição polimérica, as hemiceluloses, tal como a celulose, têm a função de providenciar suporte às paredes celulares sendo o segundo componente em maior abundância presente na madeira, com uma composição variável entre os 20 e 30% da massa total seca (Sjostrom, 1993).

As hemiceluloses são mais facilmente hidrolisáveis do que a celulose, derivado da estrutura amorfa que possuem bem como do seu baixo peso molecular (Lewin, 1991). Quando hidrolisadas, originam compostos monoméricos como a D-glucose, D-manose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose (Sjostrom, 1993).

2.2.2.3. Lenhina

A lenhina é, a seguir à celulose, o polímero orgânico mais abundante e importante no reino vegetal. Encontra-se na parede celular das células vegetais e consiste num polímero tridimensional aromático e amorfo, sendo responsável por conferir resistência mecânica às plantas, através do aumento da consistência no interior das fibras da parede celular, inibindo assim ataques microbianos (função antissética) protegendo consequentemente os hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses) da sua biodegradação. Trata-se também de uma substância hidrofóbica, impedindo fugas de água das paredes celulares (Xavier *et al.*; 2010; Lewin, 1991).

A lenhina é altamente ramificada tornando este composto numa macromolécula mais resistente à degradação microbiana. A sua diversidade química faz com que esta possua uma estrutura aleatória, impedindo o reconhecimento de enzimas capazes de degradar o composto (Lewin, 1991).

A lenhina é o terceiro maior constituinte da parede celular da biomassa lenhosa, sendo o seu principal componente não hidrolisável pelo que foi referido anteriormente (Lewin, 1991).

2.3 *Cynara cardunculus* – Características e composição química

O género *Cynara* pertence à família das *Asteraceae* e abrange 8 espécies nativas da zona do Mediterrâneo, sendo a mais selvagem e com uma grande distribuição por todo o Mediterrâneo a *Cynara cardunculus* L que é uma planta herbácea perenial (Ierna e Mauromicale, 2010).

Esta cultura, também vulgarmente conhecida como cardo, está espalhada pela Europa, Norte de África, Arquipélago da Madeira, Ilhas das Canárias e América do Norte. Na Península Ibérica, encontra-se sobretudo no Sul de Portugal e na região da Andaluzia (Cotana *et al.*, 2015; Ballesteros *et al.*, 2008).

Esta espécie cresce em habitats com condições severas, com temperaturas elevadas, escassez de água no verão, e em solos semi-áridos e rochosos, podendo atingir 3 metros de altura e ocupar uma área de 1,5m no seu ciclo de crescimento natural (Gominho, *et al.*, 2000). A sua estratégia de subsistência, proporcionadas pelas condições edafoclimáticas do Mediterrâneo, ou seja, um regime de precipitação anual reduzido e irregular com verões quentes e secos, assenta na denominada estratégia de fuga da seca. Esta estratégia passa por a parte da planta que se encontra no subsolo permanecer viva enquanto a parte da espécie que se encontra à superfície secar durante o verão (Fernández e Curt, 2004).

No que concerne à composição química da biomassa da *Cynara cardunculus* L. as diferenças existentes e apresentadas em diferentes estudos podem-se encontrar na tabela 4. Estas podem ser explicadas por variações naturais na biossíntese da planta consoante a localização geográfica e as condições climáticas e do solo (Fernandes *et al.*, 2015).

Na tabela 4, pode-se ver a composição química do cardo nomeadamente o seu conteúdo de polissacáridos (celulose e hemiceluloses) bem como de lenhina, que são, numa perspetiva de produção de biocombustíveis, os componentes mais importantes.

Verifica-se que os monossacáridos principais, a celulose e as hemiceluloses, têm uma percentagem aproximada de matéria-seca a rondar os 35% e 15% respetivamente, sendo, como referido, os compostos maioritários de materiais lenhocelulósicos.

Tabela 4 - Composição química do Cardo em % de matéria-seca adaptado de (Ballesteros *et al.*, 2008; Cotana *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2015)

| Componente | Matéria-seca do Cardo (%) | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|---|-----|--------------------------------|---|------|-----------------------------------|---|-----|
| | Ballesteros <i>et al.</i> , 2008 | | | Cotana <i>et al.</i> , 2015 | | | Fernandes <i>et al.</i> , 2015 | | |
| Extrativos | 14.3 | ± | 0.4 | 11.22 | ± | 1.08 | 1.4 | ± | 0.1 |
| Celulose | 33.8 | ± | 0.6 | 34.96 | ± | 0.29 | 41.9 | ± | 0.0 |
| Hemiceluloses | 18.5 | ± | 1.1 | 16.17 | ± | 0.28 | 12.8 | ± | 0.7 |
| Grupos acetil | 3.8 | ± | 0.1 | 4.54 | ± | 0.17 | - | | - |
| Lenhina Klason | 14.3 | ± | 0.2 | 15.84 | ± | 0.42 | 14.9 | ± | 0.1 |
| Cinzas | 6.6 | ± | 0.1 | 7.72 | ± | 0.21 | 4.6 | ± | 1.4 |

2.3.1 Produtividade de biomassa da cultura *Cynara cardunculus*

Em 2007, foi realizado um estudo em Itália que comparava a produtividade para diferentes genótipos de *C. cardunculus* L. durante 3 anos verificando-se o aumento produtivo ao longo do tempo de estudo, sendo que em média o valor correspondeu a 20 ton/ha a partir do segundo ano, havendo, no entanto, variabilidade produtiva consoante o genótipo em questão. O estudo permitiu concluir a adaptabilidade da espécie ao clima do Mediterrâneo, verificando-se produtividades consideráveis de biomassa tendo em conta o uso de fertilizantes (50 kg/ha em Outubro de cada ano), o nível de precipitação e as respetivas características do solo (Gramellis *et al.*, 2008).

Outros estudos referem que em termos produtivos e dependendo, claro está, de fatores como a precipitação e características do solo, a média anual produtiva varia entre 14 e 20 ton/ha de matéria-seca (Gominho *et al.*, 2014; Ballesteros *et al.*, 2008) sendo estimados 14/15 ton/ha de matéria-seca sem qualquer irrigação (Cotana *et al.*, 2015). É

considerada a cultura herbácea perenial Mediterrânica com maior produtividade de biomassa em regiões quentes e secas (Gominho *et al.*, 2014).

Assim, verifica-se ser uma espécie atrativa para diferentes aplicações industriais, como se verá na secção subsequente.

2.3.2 Aplicabilidades da cultura *Cynara cardunculus*

Desde a antiguidade que o Cardo é cultivado como um vegetal para utilização na alimentação humana, nomeadamente as suas folhas suculentas em sopas e saladas bem como as suas flores, usadas como coagulante natural para produção de queijo de ovelha tradicional (Kukic *et al.*, 2008).

As investigações sobre potencial produtivo e de aplicações industriais da espécie iniciaram-se na década de 1990, através de projetos apoiados pela União Europeia e por diferentes projetos nacionais em Espanha, Itália, Portugal e Grécia (Gominho *et al.*, 2014).

Contudo e, derivado a fatores referidos anteriormente, como o seu crescimento acentuado e consequente acumulação de matéria-seca, adaptabilidade a climas Mediterrâneos, baixo índice de fertilizantes e de irrigação (Cotana *et al.*, 2015) nos últimos anos surgiram diversos estudos sobre a espécie como cultura herbácea para a produção de biomassa e consequente uso em aplicações industriais. Estudou-se a produção de biocombustíveis sólidos (Dahl e Obernberger, 2004; Fernández *et al.*, 2006), de óleo a partir das sementes (Fernández e Curt, 2004; Fernández *et al.*, 2006), de pasta de papel (Fernández *et al.*, 2006; Gominho *et al.*, 2001), de forragem verde para alimentação animal (Fernández *et al.*, 2006), de compostos ativos farmacológicos (Kukic *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2006) e de biogás (Oliveira *et al.*, 2012).

Quando a espécie é utilizada para aplicações industriais como cultura para a produção de biomassa, é feita a sua colheita anualmente no verão, ou seja, quando a parte da planta a descoberto se encontra seca e com um baixo índice de humidade (Fernández *et al.*, 2006).

O potencial da espécie como cultura energética reside principalmente na sua aplicação como biocombustível sólido, derivado a ter uma elevada produção de biomassa, poucas necessidades nutritivas quer em termos de características dos terrenos de plantio, aplicação de fertilizantes e de precipitação, para além de a biomassa produzida ter um elevado calor específico, reduzida humidade e uma constituição química favorável (Fernández *et al.*, 2006; Gramellis *et al.*, 2008). O fato de possuir uma reduzida humidade, como supracitado, é uma grande vantagem quando comparada com outras culturas, pois elevada humidade afeta o transporte, o armazenamento e a conservação da biomassa (Gominho *et al.*, 2014).

No entanto, mais recentemente, começou a estudar-se (Cotana *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2015) a possibilidade de se considerar o Cardo como cultura energética para produção de biocombustíveis líquidos, concretamente etanol, por possuir um conteúdo elevado de polissacáridos e reduzido conteúdo de lenhina (Ballesteros *et al.*, 2008; Cotana *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2015).

2.3.3 Produção de etanol a partir da cultura *Cynara cardunculus*

O cardo tem sido, recentemente, objeto de estudo à escala laboratorial para a produção de etanol, com o intuito de se aplicarem metodologias capazes de viabilizar a sua produção em larga de escala. Alguns estudos como (Ballesteros *et al.*, 2008; Cotana *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2015) investigaram diferentes metodologias, procurando otimizar a produção de etanol a partir da *Cynara cardunculus* L. sendo transversal a todos eles a aplicação das etapas de redução da granulometria da biomassa, aplicação de um pré-tratamento, hidrólise enzimática e a fermentação por meio de leveduras. Na figura 6 podemos ver de forma sumária o diagrama processual de produção de etanol a partir de espécies lenhocelulósicas, neste caso da espécie supracitada.

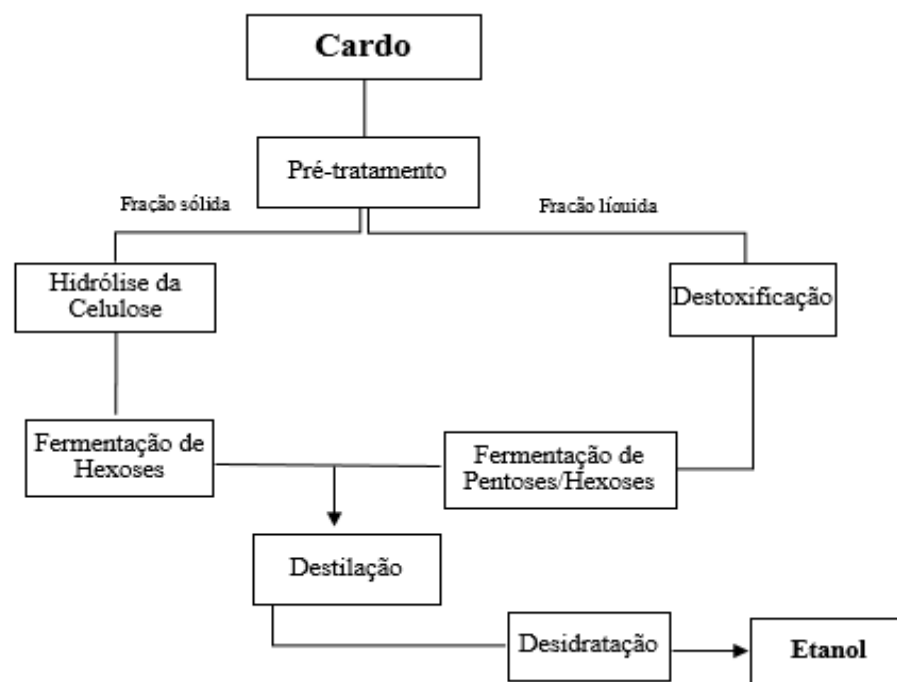


Figura 6 - Diagrama processual de produção de etanol a partir do Cardo.

As investigações anteriormente referidas (Ballesteros *et al.*, 2008; Cotana *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2015) aplicaram ao cardo as metodologias que são resumidas na tabela 5, podendo assim comparar as similaridades e diferenças existentes em cada etapa processual.

Tabela 5 - Comparação das etapas aplicadas ao bioprocesso do cardo na produção de etanol.

| Matéria-prima | Bioprocesso | | | | Ref. |
|---|--|----------------------------------|--|--|----------------------------------|
| | Pré-tratamento | Substrato | Tipo de Hidrólise | Tipo de Fermentação | |
| <i>C. Cardunculus L.</i> - aparas de caules e ramos reduzidos a 5 mm e com 5% de humidade. | Hidrólise ácida diluída com H ₂ SO ₄ a (0,2%, m/m) a 200 °C. | Fração sólida insolúvel em água. | Enzimática, com as enzimas Celluclast 1.5 L FG e Novozyme 188. | Sacarificação e Fermentação simultâneas (SSF), com a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875 | Ballesteros <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>C. Cardunculus L.</i> - aparas reduzidas a 2-3 cm e secas ao ar. | Explosão a vapor, com diferentes fatores de severidade (3.85;4.02;4.28; 4.53). | Fração sólida insolúvel em água. | Enzimática, com a enzima TM Ctec2. | Hidrólise e fermentação separadas (SHF), sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), com a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . | C Cotana <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>C. Cardunculus L.</i> - aparas de caules e ramos reduzidos a 40 - 60 mesh. | Explosão a vapor com um fator de severidade de 3.97. | Fração sólida insolúvel em água. | Enzimática, com as enzimas Celluclast 1.5 L e Novozyme 188. | Hidrólise e fermentação separadas (SHF), sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), com as estirpes da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1119 e PYCC 2613, respetivamente. | Fernandes <i>et al.</i> , 2015 |

Com base na tabela 5, facilmente se verifica que o substrato utilizado nos diferentes estudos para produção de etanol foi a fração sólida insolúvel em água sendo que, a fração líquida rica em xilose proveniente da fração hemicelulósica não foi utilizada. Embora a fração sólida, rica em glucose, seja a mais relevante do ponto de vista económico é necessário considerar-se também a fração líquida passível de ser convertida em etanol, sendo que processualmente tem diferenças, nomeadamente na etapa de destoxificação dos inibidores formados aquando o pré-tratamento, por forma a fomentar a fermentação da xilose na etapa subsequente.

O “Flagship pilot project”, projeto que terá um investimento de 87 milhões de euros e localizado na Bélgica, fará uso do cardo como fonte de matéria-prima, extraindo óleos vegetais do mesmo para conversão em produtos de valor acrescentado como lubrificantes e cosméticos e os seus resíduos para a produção de bioetanol. Este projeto prevê também

a produção de 16000 mil toneladas de bioetanol a partir de meados de 2017, sendo prevista a produção anual final de 47000 toneladas de bioetanol em 2018 (Muriel, 2015).

2.4 Pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos

Tendo em consideração o conceito de biorrefinaria, o pré-tratamento é uma etapa crucial, pois permite obter substratos para a produção de biocombustíveis. Assim, nas últimas décadas, houve um grande interesse na investigação desta etapa processual, visto tratar-se de uma das mais dispendiosas, seguida da etapa enzimática, na produção de etanol (Mood *et al.*, 2013). Esta etapa tem como objetivo remover ou alterar impedimentos estruturais ou composicionais, permitindo obter um substrato mais acessível à hidrólise enzimática dos materiais lenhocelulósicos e aumentando consequentemente a composição em açúcares fermentáveis a partir da celulose e das hemiceluloses (Conde-Méjia *et al.*, 2012; Agbor *et al.*, 2011).

Na figura 7 pode-se observar o efeito do pré-tratamento em materiais lenhocelulósicos, nomeadamente a quebra da estrutura macromolecular da madeira afetando a lenhina, promovendo a redução da estrutura cristalina da celulose, a remoção e despolimerização parcial das hemiceluloses e o respetivo aumento da porosidade da biomassa (Balat, 2011).

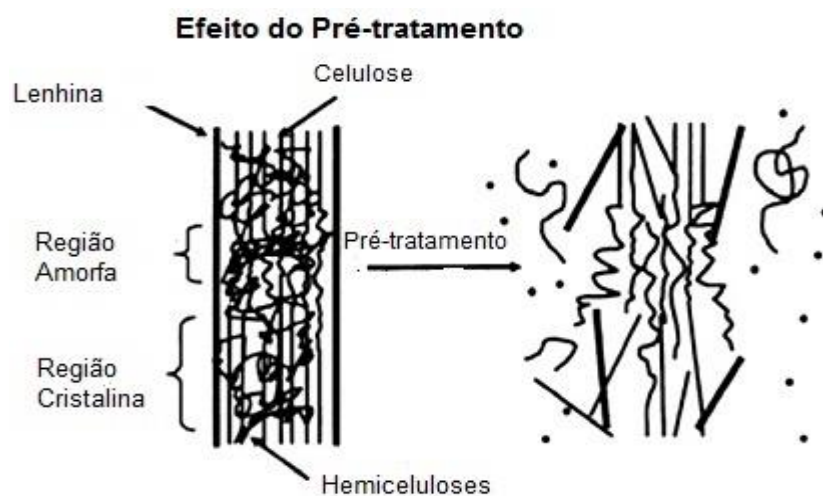


Figura 7 - Estrutura esquemática do efeito da etapa de pré-tratamento em materiais lenhocelulósicos [adaptado de (Balat, 2011)]

O pré-tratamento ideal deverá ser capaz: (1) reduzir o tamanho das partículas lenhocelulósicas; (2) maximizar a recuperação de celulose; (3) obter um substrato suscetível a hidrólise enzimática; (4) evitar a formação de produtos de degradação dos açúcares como fufural, hidroximetilfurfural e ácidos fenólicos (inibidores da fermentação); (5) deslenhificar e simultaneamente preservar as hemiceluloses e (6) requerer um baixo custo operacional e de energia (Galbe e Zacchi, 2012; Balat, 2011).

No entanto, não existe um pré-tratamento universal que abranja todas estas características e que seja aplicável a todos os tipos de biomassa lenhocelulósica (Agbor *et al.*, 2011) pois cada método apresenta vantagens e desvantagens, não existindo assim um que seja claramente superior aos restantes (Agbor *et al.*, 2011; SPBT, 2013). A seleção do pré-tratamento e das suas condições operacionais é fundamental, ou não estivesse a separação de um componente associado a uma possível degradação dos componentes químicos restantes.

2.4.1. Processos de fracionamento seletivo das hemiceluloses da biomassa lenhocelulósica

A tipologia generalizada de pré-tratamentos, que permite a produção de monossacáridos acessíveis aos microrganismos, está agrupada em: (1) físicos (tratamento mecânico por trituração e moagem, ultrassons, micro-ondas, radiação); (2) físico-químicos (auto-hidrólise, explosão a vapor, fluídos supercríticos); (3) químicos (líquidos concentrados, peróxido de hidrogénio, ozónio, ácidos diluídos ou concentrados, bases alcalinas com hidróxido de sódio, organosolv) e (4) biológicos (fungos de biodegradação) (Agbor *et al.*, 2011; Galbe e Zacchi, 2012; Mood *et al.*, 2013).

Direcionando para o fracionamento seletivo das hemiceluloses presentes na biomassa lenhocelulósica, as principais opções de processos aplicáveis incluem o uso de ácidos, água (líquida ou vapor), solventes orgânicos e agentes alcalinos. No entanto, quer os solventes orgânicos quer os agentes alcalinos, não são exclusivos na remoção das hemiceluloses pois também removem a lenhina o que por sua vez pode prejudicar,

posteriormente, a fermentação dos hidrolisados uma vez que os compostos derivados da lenhina são usualmente inibidores do crescimento microbiano (Gírio *et al.*, 2010).

Assim sendo, os pré-tratamentos ácidos (diluídos e concentrados) e hidrotérmicos (auto-hidrólise e explosão a vapor), são as tecnologias mais comumente aplicadas que permitem uma hidrólise seletiva das hemiceluloses, produzindo uma fração líquida rica e hidrolisada total ou parcialmente a açúcares oligoméricos e monoméricos bem como originando uma fração sólida rica em glucose para posterior bioprocessamento (Gírio *et al.*, 2010).

2.4.1.1 Processos químicos

Alguns tratamentos químicos, como os ácidos, alcalinos, solventes orgânicos e líquidos iônicos, têm sido reportados como tendo um efeito significativo na estrutura lenhocelulósica da madeira nativa (Agbor *et al.*, 2011). Contudo, o caso mais usado à escala laboratorial é o tratamento ácido (diluído) para o fracionamento seletivo das hemiceluloses presentes no material lenhocelulósico (Gírio *et al.*, 2010).

Processos ácidos

Os processos químicos aplicados à hidrólise da biomassa lenhocelulósica, maioritariamente, utilizam ácidos como forma de tratamento. O catalisador ácido mais comumente utilizado é o ácido sulfúrico (H_2SO_4), sendo também investigados o ácido clorídrico (HCL), nítrico (HNO_3) e trifluoroacético (TFA) (Chiaramonti *et al.*, 2012).

Nesta vertente, habitualmente são utilizadas duas tipologias: a combinação de uma baixa concentração de ácido com uma temperatura elevada (ácidos diluídos), ou uma temperatura moderada com uma concentração elevada de ácido (ácidos concentrados) (Mood *et al.*, 2013).

Processo com ácido diluído

O pré-tratamento químico com ácido diluído, em particular o ácido sulfúrico, é um dos métodos mais efetivos e comuns no tratamento de biomassa lenhocelulósica, sendo um método adequado para a hidrólise seletiva das hemiceluloses e originando, consequentemente, monossacáridos e ácido acético (Ballesteros *et al.*, 2008, Mood *et al.*,

2013). A alta temperatura deste resulta na hidrólise das hemiceluloses (em xilose, arabinose, manose, galactose e glucose) aumentando assim a porosidade e melhorando a digestibilidade enzimática (Ballesteros *et al.*, 2008).

Uma vez que as hemiceluloses apresentam uma estrutura amorfa e baixo peso molecular (Lewin, 1991), a combinação de uma concentração de ácido baixa com uma alta temperatura, resulta na hidrólise quase integral das hemiceluloses (Agbor *et al.*, 2011). Esta hidrólise seletiva da biomassa proporciona uma fração sólida rica em celulose, mais acessível ao ataque enzimático posterior, e uma fração líquida constituída pelos monómeros das hemiceluloses supracitados (Chiaramonti *et al.*, 2012).

Em termos processuais, a hidrólise ácida diluída é geralmente realizada com concentrações abaixo dos 4% (em massa) como no caso do ácido sulfúrico e com uma gama de temperaturas que pode variar entre os 140°C e os 200°C. O tempo de residência pode compreender entre alguns min. a uma hora (Galbe e Zacchi, 2012).

No trabalho realizado por Ballesteros *et al.*, para pré-tratamento do cardo e produção de etanol, foi estudada a influência da temperatura, da concentração do ácido sulfúrico aplicado e a razão sólido/líquido no rendimento global de açúcares fermentáveis. Nas experiências realizadas, o rendimento de xilose na fração líquida originada após o pré-tratamento foi de 0,9g/100 de cardo, quando a biomassa foi tratada a 160°C e sem adição de ácido. Quando foi aplicado à mesma um pré-tratamento nas condições de 180 °C e 0,1-0,2 % (m/m) de concentração do ácido, foram obtidos 13,5 g/100 de cardo, o rendimento máximo obtido de xilose fermentável (Ballesteros *et al.*, 2008).

O catalisador ácido diluído apresenta como vantagens, como referido anteriormente, a solubilização seletiva de uma grande quantidade das hemiceluloses aumentando, necessariamente, a acessibilidade à celulose na biomassa sendo que também produz menor formação de inibidores à etapa fermentativa e de corrosibilidade de equipamentos quando em condições controladas, comparativamente a ácidos concentrados, sendo também menor o gasto energético na recuperação do ácido (Mood *et al.*, 2013).

No entanto, poderá existir a formação de inibidores neste processo, como ácidos carboxílicos, compostos furanos e fenólicos. Assim, aquando da hidrólise ácida seletiva

das hemiceluloses, os monómeros produzidos como a xilose e a glucose, podem ser degradadas em hidroximetilfurfural e furfural, isto quando são submetidas a temperaturas e pressões elevadas e também quando o tempo da reação for superior a uma hora, provocando a diminuição da concentração destes açúcares em virtude da sua degradação parcial (Chiaramonti *et al.*, 2012). Por sua vez, poderá existir a degradação do furfural e do hidroximetilfurfural a ácido fórmico e levulínico, respetivamente. Os compostos fenólicos são resultantes da degradação parcial da lenhina. Outra desvantagem associada a este processo prende-se com a ineficiência no que diz respeito à dissolução da lenhina (Chiaramonti *et al.*, 2012).

Assim, e devido aos inibidores supracitados, é necessária uma etapa subsequente que permita fermentar a fração líquida rica em monossacáridos provenientes da fração hemicelulósica, etapa essa designada de acondicionamento e destoxificação dos hidrolisados (Duarte *et al.*, 2013; Agbor *et al.*, 2011).

Processo com ácido concentrado

Os processos em que o catalisador é um ácido concentrado conseguem hidrolisar tanto as hemiceluloses como a celulose. A solubilização dos polissacáridos anteriormente referida é alcançada utilizando diferentes concentrações consoante o catalisador ácido utilizado, ou 72% H₂SO₄, ou 41% HCL ou 100% TFA, sendo que estes dois últimos apresentam a vantagem de serem mais facilmente recuperáveis. Os processos com ácido concentrado apresentam a vantagem de poderem ser realizados a baixas/médias temperaturas, proporcionando uma redução dos custos operacionais (Gírio *et al.*, 2010).

Este é, no entanto, um processo menos usual pela corrosibilidade nos equipamentos, toxicidade, custos envolvidos quer na recuperação do ácido quer no acondicionamento e destoxificação dos hidrolisados provenientes da fração líquida, apresentando também degradação dos monossacáridos nomeadamente da glucose e produção de inibidores fermentativos em maior quantidade, quando comparada com a hidrólise com ácido diluído, sendo estes os grandes entraves que condicionam a aplicação generalizada deste método (Agbor *et al.*, 2011; Mood *et al.*, 2013)

2.4.1.2 Processos hidrotérmicos

Os processos hidrotérmicos incluem principalmente a auto-hidrólise (“liquid hot water”) e a explosão com vapor. Na génese destes dois processos, está a utilização de água, vapor, ou ambos combinados com o fornecimento de calor para o tratamento da biomassa lenhocelulósica. Em ambos os casos o objetivo é, como referido anteriormente, a solubilização parcial ou total das hemiceluloses dos materiais lenhocelulósicos através da hidrólise dos grupos acetilo destas, originando fundamentalmente açúcares oligoméricos e uma fração sólida rica em celulose propícia para uma hidrólise enzimática posterior. Nestes processos, nenhum catalisador ácido é adicionado, tornando-os económica e ambientalmente atrativos (Gírio *et al.*, 2010)

Processo de auto-hidrólise

O processo de auto-hidrólise utiliza água líquida comprimida. As temperaturas usadas variam entre os 150 °C e os 230 °C, sendo que o tempo da reação depende da temperatura e pode variar entre segundos a horas. Este processo tem um mecanismo similar ao pré-tratamento com ácido diluído uma vez que ambos são catalisados por iões H_3O^+ (Carvalho *et al.*, 2008).

Este é um processo que apresenta uma taxa relativamente elevada na recuperação das hemiceluloses, entre 55 – 84% e com um nível baixo de inibidores formados (Gírio *et al.*, 2010).

No que concerne à celulose e lenhina, estas não são significativamente degradadas no processo de tratamento, resultando subsequentemente uma fração sólida, constituída pela lenhina e pela celulose, conjuntamente uma fração líquida e possuindo ambas uma concentração relativamente baixa de inibidores à etapa fermentativa (Gírio *et al.*, 2010). Outro fato proeminente deste processo a pH moderado (Carvalho *et al.*, 2008), é que evita a corrosibilidade nos equipamentos e as etapas para a reciclagem do ácido e remoção dos precipitados deixam de ser necessárias, melhorando assim o custo operacional, sendo também benéfico em termos ambientais (Gírio *et al.*, 2010).

A maior desvantagem deste processo, quando se utiliza a fração líquida para a produção de etanol através da fermentação é que as hemiceluloses solubilizadas surgem

maioritariamente na forma oligomérica o que implica ainda um processo de hidrólise destes (Gírio *et al.*, 2010).

Processo de explosão a vapor

Na explosão a vapor, a biomassa lenhocelulósica é submetida repentinamente a um *flash* de vapor de água saturado a elevada pressão, sofrendo esta posteriormente um abaixamento brusco, evaporando-se assim a humidade e provocando a desagregação da matriz lenhocelulósica através da quebra das ligações inter e intramoleculares (Carvalho *et al.*, 2008).

No que toca às condições processuais, por norma o material é aquecido entre 210-290°C e pressões que variam entre os 20 – 50 bar, por um curto período de tempo, entre segundos a alguns min. (Carvalho *et al.*, 2008).

Segundo Gírio *et al.*, (2010) alguns estudos mostraram a recuperação de açúcares sem catalisador a variar entre 45 - 69%. A maioria dos tratamentos com explosão a vapor proporciona uma elevada solubilidade da hemicelulose, maioritariamente oligossacáridos, e também uma ligeira solubilização da lenhina aumentando assim a digestibilidade enzimática da biomassa. No entanto também é usual adicionar-se um catalisador ácido como o H₂SO₄ ou SO₂ ou agentes alcalinos como a amónia (Gírio *et al.*, 2010).

Este pré-tratamento tem sido utilizado em diferente biomassa lenhocelulósica, tal como em resíduos de agricultura como a espécie *Cynara cardunculus* para a produção de etanol (Carvalho *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2015).

Tal como no caso anterior, este processo também apresenta menor índice de corrosibilidade dos equipamentos, sendo que neste caso a reciclagem do catalisador depende da metodologia aplicada. (Carvalho *et al.*, 2008; Gírio *et al.*, 2010).

Na tabela 6 é possível comparar-se os pré-tratamentos mais usualmente aplicados ao fracionamento seletivo das hemiceluloses da biomassa lenhocelulósica, sendo de destacar em especial a hidrólise ácida diluída e a explosão a vapor no que à recuperação das hemiceluloses diz respeito.

Tabela 6 - Comparação de processos de fracionamento seletivo das hemiceluloses de materiais lenhocelulósicos [adaptado de Gírio *et al.*, 2010]

| | Fracionamento seletivo das hemiceluloses | | | |
|-------------------------------|--|-------------|-------------------------------|--------------------|
| | Pré-tratamento químico | | Pré-tratamento físico-químico | |
| | Ácidos | | Hidrotérmicos | |
| | Diluído | Concentrado | Auto-hidrólise | Explosão com vapor |
| Temperatura | ↑ | ↓/0 | ↑ | ↑ |
| Remoção das hemiceluloses | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Recuperação das hemiceluloses | ↑ | 0 | ↑ | 0 |
| Remoção da celulose | ↓ | ↑ | ↓ | ↓ |
| Digestibilidade enzimática | ↑ | N.A. | ↑ | ↑↑ |
| Remoção da lenhina | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Formação de inibidores | ↓/0 | ↓/↑ | ↓ | ↓/0 |
| Corrosão de equipamentos | 0 | ↑ | ↓ | ↓ |
| Energia necessária | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ |
| Recuperação dos catalisadores | Difícil | Necessário | N.A. | N.A. |
| Formação de resíduos | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Implementado à escala piloto | Sim | Sim | Sim | Sim |

↑, elevado; ↓, baixo; 0, moderado; E.E., em estudo; N.A., não aplicável

2.5. Processo de destoxificação A necessidade de uma etapa de destoxificação é justificada pela presença de inibidores nos hidrolisados (derivados de furanos, compostos fenólicos e os ácidos alifáticos) que são prejudiciais ao crescimento microbiano, uma vez que afetam a absorção de açúcares por parte dos microrganismos fermentativos, diminuindo consequentemente o rácio de etanol produzido (Zhang *et al.*, 2015). Para além de um processo de destoxificação, também há outras opções como a adaptação de microrganismos aos hidrolisados (Mussatto e Roberto., 2004).

Dois inibidores comuns são o ácido acético e o furfural. Está reportado que o ácido acético é o composto mais abundante nos hidrolisados (Zhang *et al.*, 2015) e o furfural o inibidor mais tóxico para os microrganismos mesmo a concentrações baixas, sendo este último capaz de inibir o crescimento em 25% e 47% quando se apresenta com uma concentração de 0.5 e 1 g/L, respetivamente (Palmqvist., *et al.*, 2000). Fica assim patente a necessidade de se destoxificar e concentrar os hidrolisados lenhocelulósicos a serem fermentados.

2.5.1 Classificação dos métodos de destoxificação

Várias abordagens ao longo dos últimos anos foram sendo propostas por forma a reduzir a concentração dos inibidores ou transformá-los em compostos inativos sendo estas subdivididas em três métodos principais: (1) físicos (evaporação e separação por membrana); (2) químicos (neutralização, tratamento com carvão ativado, resinas de troca iónica e *overliming*) e (3) biológicos (microrganismos e enzimas) (Mussatto e Roberto., 2004; Moreno *et al.*, 2013).

A escolha do método de destoxificação eficiente é importante uma vez que esta etapa tem a si associados custos que podem afetar a viabilidade do processo. A efetividade do método de destoxificação depende do tipo de hidrolisado das hemiceluloses e da espécie de microrganismo utilizado, pois cada tipo de hidrolisado apresenta um grau de toxicidade diferente e cada espécie de microrganismo tem um grau de tolerância diferente aos inibidores. Como tal, antes de selecionar-se o método deve-se considerar a composição do hidrolisado, que varia de acordo com a matéria-prima e com o pré-tratamento previamente aplicado podendo utilizar-se consoante o objetivo a alcançar a combinação de mais de um método de destoxificação (Mussatto e Roberto, 2004).

2.5.2 Destoxificação com carvão ativado

Este pré-tratamento, de entre os supracitados, é possivelmente o que apresenta maior número de aplicações, sendo utilizado para remover por adsorção os inibidores dos hidrolisados, isto é, promovendo-se o contacto direto do hidrolisado proveniente das hemiceluloses com carvão numa coluna empacotada ou simplesmente num processo

descontínuo. Para que este processo seja eficiente no que concerne à adsorção dos compostos inibidores, tem de ter em conta a interação de algumas variáveis como: pH do hidrolisado, temperatura, tempo de contacto, concentração do carvão, porosidade e granulometria do carvão (Mussatto e Roberto., 2004).

O processo de destoxificação por norma é descrito com o carvão ativado com agentes ácidos, levando à consequente perda de açúcares e necessidade de acerto de pH subsequente. Pelo contrário quando a ativação do carvão é feita com um agente alcalino como o hidróxido de sódio no qual não é necessário o acerto do pH (Duarte *et al.*, 2013).

Algumas das principais vantagens de a ativação do carvão ser feita com um agente alcalino são que para além de o acondicionamento e destoxificação dos hidrolisados serem realizados numa única etapa processual, também se obtém não só a remoção quase total dos compostos fenólicos e furanos como também a regeneração do carvão, permitindo assim a sua reutilização (Duarte *et al.*, 2013; Salgado *et al.*, 2012).

2.5.3 Destoxificação com membranas

O processo de destoxificação com membranas, nomeadamente a microfiltração, a ultrafiltração, a osmose inversa e a nanofiltração, apesar de anteriormente terem mostrado ser um processo vantajoso em diferentes campos da biotecnologia, quando comparado com outros processos de separação e purificação, pois apresentam um baixo gasto energético, são sustentáveis e flexíveis só recentemente passaram a ser considerados na destoxificação de hidrolisados lenhocelulósicos (Nguyen *et al.*, 2015).

Estes processos são utilizados para, consoante as especificações pré-determinadas, purificar, separar ou concentrar compostos, como os hidrolisados. A utilização de membranas, nomeadamente a nanofiltração, proporciona uma elevada remoção de inibidores de baixo peso molecular (Duarte *et al.*, 2013). Isto acontece porque as membranas utilizadas atuam como uma barreira semipermeável, no qual passa uma corrente inicial designada de alimentação, originando duas correntes subsequentes. A primeira, onde os compostos com massa molecular inferior ao limite de exclusão da membrana são filtrados originando uma corrente chamada de permeado, constituída por

inibidores como o ácido acético, fórmico, levulínico, o furfural e o hidroximetilfurfural. A solução composta por solutos de massa molecular superior ao limite de exclusão da membrana, como os açúcares de 5 e 6 carbonos, fica retida, originando uma segunda corrente chamada de concentrado (Nguyen *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2011).

No entanto para além da remoção eficaz de inibidores, o processo de nanofiltração pode também levar a uma perda significativa de açúcares monoméricos. Assim quando se aplica a nanofiltração, para além da remoção de compostos inibidores também se verifica a diluição do hidrolisado sendo assim necessário concentrar o mesmo para os níveis iniciais através da nanofiltração. Deste modo, o tempo de operação é maior, sendo apenas reduzido com maiores investimentos em equipamento e custos de operação (Duarte *et al.*, 2013).

Outro requisito necessário para a eficiência da nanofiltração tem a ver com o acerto de pH, pois as membranas utilizadas não suportam o pH apresentado pelos hidrolisados lenhocelulósicos, aumentando assim o número de etapas unitárias do processo (Duarte *et al.*, 2013).

2.5.4 Evaporação

O método da evaporação sob vácuo é um método capaz de destoxificar e concentrar o hidrolisado em simultâneo uma vez que tem a capacidade de remover compostos voláteis e simultaneamente aumentar a concentração dos hidrolisados (Zhang *et al.*, 2015).

Contudo é, por norma, um método complementar a outros métodos de destoxificação, uma vez que para além do aumento da concentração de açúcares, proporciona também o aumento da concentração de compostos não voláteis como os compostos fenólicos e do hidroximetilfurfural, podendo levar à inibição do crescimento microbiano e à necessidade subsequente de remover esses mesmos compostos para a etapa fermentativa (Duarte *et al.*, 2013).

2.6. Produção de etanol lenhocelulósico

Para combater a depleção dos combustíveis fósseis, nomeadamente o seu consumo no setor dos transportes, a conversão eficiente de materiais lenhocelulósicos em etanol tornou-se imperativa. Nesse sentido, tem surgido desenvolvimento tecnológico nos processos de bioconversão dos materiais lenhocelulósicos para fazer face ao cenário supracitado, tendo sempre como objetivo final a comercialização de etanol a um preço competitivo (Fu *et al.*, 2009). No entanto, para que possa ser competitivo comercialmente ainda existem várias aspetos a serem melhorados.

A produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica requer a seleção e uso de microrganismos adequados para a fermentação, na maioria dos casos, dos açúcares presentes na biomassa. Considerando o bioprocessos a nível industrial, os microrganismos devem obedecer a alguns pressupostos: (1) Elevado rendimento de bioetanol produzido; (2) crescimento rápido em meio de cultura económico e (3) elevado grau de tolerância aos inibidores microbianos (Dien *et al.*, 2003).

Para que o rendimento de etanol produzido seja maximizado é imperativo efetuar-se uma conversão completa e eficiente, isto é, utilizar-se os açúcares provenientes quer da fração celulósica (hexoses) quer da fração hemicelulósica (pentoses e hexoses) uma vez que correspondem a cerca de dois terços da massa dos materiais lenhocelulósicos e são os substratos para a produção de etanol de segunda geração (Gírio *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2012). Assim sendo, a conversão microbiana da fração hemicelulósica é essencial para aumentar o rendimento de etanol dos materiais lenhocelulósicos (Gírio *et al.*, 2010). As reações de fermentação alcoólica a partir de hexoses e de pentoses são, respetivamente:

Equação (1)



Equação (2)



O grande entrave à bioconversão das pentoses e hexoses em simultâneo prende-se com a celulose e as hemiceluloses não serem quimicamente homogêneas, sendo os microrganismos, como por exemplo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, incapazes de fermentar pentoses, pois não possuem um sistema enzimático apto a fazer a sua metabolização. Isto resulta em processos hidrolíticos diferentes para cada um dos substratos (Gírio *et al.*, 2010) nos quais estão inseridos diferentes microrganismos para cada uma das frações pois não existe nenhum microrganismo selvagem que consiga converter eficientemente as hexoses e pentoses em etanol (Fu *et al.*, 2009). Duas abordagens mais comumente utilizadas são, como supracitado, a utilização de dois microrganismos diferentes ou utilização de estirpes geneticamente modificadas de leveduras, fungos ou bactérias para a bioconversão de ambas as frações em etanol (Fu *et al.*, 2009; Ballesteros *et al.*, 2008)

2.6.1 Bioconversão de hidrolisados hemicelulósicos em etanol

Os açúcares monoméricos ou oligoméricos, provenientes da fração celulósica e hemicelulósica, podem ser fermentados a etanol por bactérias, leveduras ou fungos filamentosos. Se por um lado a tecnologia aplicada na fermentação de hexoses, usando bactérias e leveduras, já é sobejamente conhecida e estabelecida, por outro a informação e conhecimento sobre esses microrganismos para fermentar pentoses ainda se encontra em desenvolvimento (Chandel *et al.*, 2011; Kuhad *et al.*, 2011).

As leveduras identificadas, até agora, como mais promissoras no processo de conversão de pentoses são: *Candida shehatae*, *Scheffersomyces stipitis*, e *Pachysolen tannophilus* (Chandel *et al.*, 2011; Kuhad *et al.*, 2011). No entanto, o uso destas leveduras para a produção de etanol a partir da xilose a nível comercial é limitada, devido ao seu processo de fermentação moroso, aos requisitos de regulação específicos de oxigénio, sensibilidade à presença de inibidores e baixa tolerância ao etanol (Kuhad *et al.*, 2011).

Assim sendo, têm sido efetuados esforços no sentido de se desenvolver uma estirpe a nível industrial, através da clonagem e utilizando genes sejam que comuns à *Saccharomyces cerevisiae*, à *Zymomonas mobilis* e à *Escherichia coli*, que permitam obter-se a expressão do metabolismo das pentoses, sendo no entanto um desafio

desenvolver uma estirpe que abranja todos os requisitos na produção de etanol a nível industrial (Chandel *et al.*, 2011) e que conduzam ao bioprocessamento consolidado (CBP- consolidated bioprocessing) (Gírio *et al.*, 2010). Neste processo, realizado num único reator, o objetivo passa por desenvolver microrganismos que contribuam para quatro eventos requeridos no processo de conversão eficiente de lenhocelulósicos em etanol que são: a produção de enzimas sacarolíticas; a hidrólise dos polissacáridos presentes na biomassa pré-tratada; a fermentação das hexoses e a fermentação das pentoses (Gírio *et al.*, 2010).

2.6.2 Microrganismos fermentativos de pentoses

A seletividade dos microrganismos é de sobremaneira importante por forma a poder-se construir um bioprocessamento consolidado. Neste sentido apesar de inúmeros microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos serem reportados como aptos a fermentar hidrolisados de materiais lenhocelulósicos em etanol, os mais relevantes são a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Zymomonas mobilis*, a *Escherichia coli* e a *Scheffersomyces stipitis* (Gírio *et al.*, 2010).

2.6.2.1. *Escherichia coli*

Um dos microrganismos escolhidos para este estudo foi a *Escherichia coli*. Esta bactéria, gram-negativa, apresenta características vantajosas como microrganismo base para o desenvolvimento de estirpes para a produção de etanol, sendo mesmo uma das primeiras aplicações bem-sucedidas da engenharia metabólica (Dien *et al.*, 2003). As vantagens associada a esta bactéria modificada incluem a capacidade de fermentar um amplo espectro de açúcares, nomeadamente hexoses e pentoses, e fontes de carbono usando unicamente sais minerais como fonte de nutrientes, possui um crescimento rápido tanto em aerobiose como em anaerobiose, o seu genoma é completamente conhecido e estão disponíveis metodologias capazes de o modificar (Jimenez *et al.*, 2012).

A gama de crescimento desta bactéria está limitada a um pH próximo da neutralidade (pH de 6.0 – 8.0), tornando a fermentação bacteriana suscetível a contaminações, possui

uma baixa tolerância aos inibidores derivados dos lenhocelulósicos, baixa tolerância ao etanol e a formação de uma mistura de produtos (etanol, ácido acético, ácido lático e outros), reduzindo o rendimento de etanol, sendo assim principais desvantagens associadas à utilização da *E. coli*, (Gírio *et al.*, 2010).

Com o intuito de contornar algumas destas limitações supracitadas, como a intolerância a certos inibidores e simultaneamente aprimorar-se o rendimento fermentativo de pentoses e hexoses provenientes de materiais lenhocelulósicos em etanol, tem sido feito investigação e desenvolvimento contínuo na procura de se criarem novas estirpes através da manipulação genética. Neste sentido, foi desenvolvida a estirpe *E. coli* MS04, desenvolvida da *E. coli* JU15A (estirpe desenvolvida a partir da *E. coli* JU15) com a capacidade de crescer em glucose e xilose na presença de ácido acético e produzir etanol (Jimenez *et al.*, 2012).

Jimenez *et al.* (2012) testou a habilidade da referida estirpe para a produção de etanol a partir de hidrolisados de gramíneas (*Paspalum fasciculatum*) de crescimento rápido.

No caso supracitado, o hidrolisado gerado a partir da hidrólise das hemiceluloses, através de um pré-tratamento químico a 121 °C, usando ácido sulfúrico com diferentes concentrações (1, 2 e 4 % m/m) e diferentes tempos (10, 30 e 60 min.) e condições de reação, possuía uma média de 28,8 g/L de açúcares, sendo maioritariamente xilose (5,5 g/L glucose, 19,6 g/ xilose e 3,7 g/L arabinose), 6,2 g/L acetato e pequenos quantidades de furanos. O hidrolisado foi tratado com hidróxido de cálcio, neutralizado e suplementado com sais para fermentar os referidos açúcares. A etapa fermentativa ocorreu em volumes de 200 ml à temperatura de 37°C e pH 7, que foi sendo ajustado automaticamente ao longo do tempo de fermentação através da adição de 2 N KOH. Os resultados obtidos neste teste indicaram que a eficiência de conversão de açúcares em etanol foi 95% do valor teórico, sendo convertidos praticamente todos os açúcares em etanol ao cabo de 36 horas de fermentação (Jiménez *et al.*, 2012).

2.6.2.2. *Scheffersomyces stipitis*

O segundo microrganismo escolhido para a realização deste estudo foi a *Scheffersomyces stipitis*, uma levedura ascomicetes que se encontra na madeira em decomposição bem como nas larvas de insetos que nela habitam (Agbogbo e Coward-Kelly, 2008).

Contrariamente à *S. cerevisiae*, a *S. stipitis* tem a capacidade natural de utilizar a D-xilose e consequentemente fermentar a xilose para além da glucose. Como referido anteriormente, as leveduras mais promissoras a este nível são a *Candida shehatae*, a *S. stipitis* e a *Pachysolen tannophilus*, sendo que a *S. stipitis* demonstrou ser a levedura mais promissora para aplicações industriais, pois obtém um elevado rendimento em etanol produzido a partir da xilose (Agbogbo *et al.*, 2006; Nigam, 2000). Além de conseguir fermentar a xilose, é também capaz de fermentar, com um rendimento relativamente elevado, a maioria dos açúcares quem se encontram na madeira como a glucose, manose, galactose, tendo ainda a capacidade de fermentar a celobiose bem como os oligómeros manano e xilano presentes nos materiais lenhocelulósicos (Farias *et al.*, 2014; Jeffries, 2008).

A maior desvantagem associada a esta levedura é a baixa capacidade para tolerar etanol. É sabido que a eficiência do processo fermentativo é afetada pelo meio de cultura e pelas condições operacionais sendo que estirpes diferentes requerem fontes nutritivas específicas para, eficientemente, converter os açúcares nos produtos desejados (Farias *et al.*, 2014). Nutrientes como, o azoto, elementos vestigiais ou vitaminas podem ser necessários para se atingir uma fermentação rápida e com elevado rendimento de etanol (Farias *et al.*, 2014).

Para além das vantagens mencionadas anteriormente, esta levedura consome rapidamente a xilose presente no substrato, e sendo este o segundo hidrato de carbono mais abundante na natureza e o composto maioritário resultante dos hidrolisados hemicelulósicos, faz com que esta espécie seja estudada extensivamente para o desenvolvimento de novas estirpes que otimizem a produção de etanol e sejam mais resistentes aos inibidores, uma vez que a *S. stipitis* é bastante sensível aos inibidores presentes nos lenhocelulósicos (Gírio *et al.*, 2010; Xavier *et al.*, 2010).

A *S. stipitis* é uma levedura respiratória, não produzindo etanol em condições aeróbias mesmo na presença de açúcares em excesso (Agbogbo e Coward-Kelly, 2008, Gírio *et al.*, 2010). Como tal, o oxigénio disponível é considerado o maior fator que afeta a conversão eficiente da xilose em etanol. A capacidade desta levedura em metabolizar a xilose está diretamente relacionada com a concentração de oxigénio presente no meio, que deve ser controlado em condições microaerofílicas por forma a evitar o desvio do fluxo de carbono para o crescimento celular, em detrimento da formação de etanol (Farias *et al.*, 2014). O oxigénio por si só desempenha um papel importante no crescimento celular, no balanço redox, no funcionamento das mitocôndrias e na geração de energia para o transporte da xilose na *S.stipitis*. (Agbogbo e Coward-Kelly, 2008).

Esta levedura consegue produzir até 57 g de etanol por litro a partir da xilose, quando o pH é mantido entre 4.5 e 6. A temperatura ótima de fermentação é de 25°C a 26°C para a xilose e de 30°C para glucose (Jeffries, 2008.).

A presença de ácido acético nos hidrolisados a concentrações de 0,8 e 13,8 g/L a pH 5,1 e 6,5, respetivamente, inibem o rácio volumétrico de etanol produzido em sensivelmente 50%, sob condições anaeróbias (Jeffries, 2008).

A *S. stipitis* pode ser adaptada por forma a tolerar as concentrações elevadas de ácido acético (Jeffries, 2008). Neste sentido, foi dado um passo importante através da sequenciação do seu genoma, o que por si só fornece as matrizes para o desenvolvimento de novas estirpes através de manipulações genéticas que levem a um aumento da sua resistência aos inibidores e ao melhoramento do rendimento produtivo de etanol (Agbogbo e Coward-Kelly, 2008).

Um exemplo é a estirpe *S. stipitis* CBS 5773, frequentemente utilizada na literatura (Krahulec *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2008; Dellweg *et al.*, 1984; Dijken *et al.*, 1987).

Dellweg *et al.* (1984) estudou a produção de etanol para as estirpes *S. stipitis* 5773, 5774, 5775 e 5776, sob condições aeróbias e condições anaeróbias. O rendimento de etanol para as referidas estirpes e em condições de anaerobiose variou de 0.32 – 0.40 g de etanol por g de xilose, sendo a concentração inicial de xilose de 30 g/L. A estirpe *S. Stipitis* CBS 5773 foi reportada, pelo mesmo autor, como tendo aumentado de 0.24 para

0,49 g/g o rendimento de etanol, em função do decréscimo da concentração inicial de xilose de 50 para 5 g/L. Segundo este, o rendimento de etanol produzido é superior para concentrações de xilose mais baixas.

Valores similares aos acima mencionados, no que concerne à produção de etanol, apresentou o estudo de Krahulec *et al.* (2012), tendo este obtido um rendimento de etanol de aproximadamente 0.41 g/g, sendo a concentração inicial de xilose de 22 g/L. Este estudo, refere também que o valor de etanol obtido a partir da estirpe da *S. stipitis*, foi independente das condições utilizadas, isto é, quer em condições aeróbias, quer em condições anaeróbias, o rendimento apresentado foi similar, não existindo assim sensibilidade ao oxigénio disponível e contrariando grande parte da bibliográfica consultada. Esta perspetiva é também defendida por Dijken *et al.* (1987).

Marques *et al.*, (2008) avaliou a produção de etanol, a partir de pasta de papel, usando a referida estirpe na comparação da fermentação simultânea (sacarificação e fermentação simultâneas-SSF) e sequencial (hidrólise e fermentação separadas-SHF). Foi obtido um valor ligeiramente superior no rendimento na SHF, correspondendo a uma concentração de etanol de 19,6 g/L, sendo, no entanto, necessárias 179 horas. Por sua vez, o processo SSF foi completado após 48h de incubação, produzindo 18,6 g/L de etanol a partir de 178,6 g/L. de matéria seca de pasta de papel reciclado, correspondendo a um rendimento global de conversão de 51% dos hidratos de carbono disponíveis no substrato inicial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Cynara cardunculus*

A biomassa utilizada neste trabalho de investigação, vulgo cardo, foi uma cultura com mais de 3 anos, que foi colhida já seca num terreno pertencente à Escola Superior Agrária de Beja, em 2008. Os caules e as folhas do cardo foram reduzidos e peneirados por forma a serem obtidas partículas com um tamanho de 40-60 mesh para posteriormente ser aplicado o pré-tratamento de hidrólise ácida diluída. Para a realização da hidrólise ácida diluída, aferiu-se em primeiro lugar o peso seco do cardo por forma a ser determinada a percentagem de humidade presente na biomassa, sendo esta igual a 8,68%.

3.2 Preparação de hidrolisado de cardo

O pré-tratamento do cardo de hidrólise ácida diluída tem como objetivo principal a solubilização das hemiceluloses e possibilitar um maior acesso de celulasas à celulose. O objeto de estudo neste trabalho foi a fração líquida resultante, ou seja, a fermentação dos açúcares monoméricos provenientes das hemiceluloses.

Para a realização da hidrólise ácida, foi preparado um ensaio em duplicado em frasco *Schott* de 1000 ml e com a finalidade de obter-se uma razão líquido-sólido de 10 g_{solução ácida}/g_{biomassa}. Pesou-se 50 g de cardo, sendo considerado o teor de humidade determinado previamente presente na biomassa por forma a adicionar-se o volume correto da solução *stock* de H₂SO₄ (6,7%) (m/m). Assim foi adicionado 50 g de cardo e 495,7 ml da solução ácida 6,7%, perfazendo-se a razão líquido-sólido de 10, tendo em conta a humidade presente na amostra. A hidrólise ácida foi realizada a 121 °C em autoclave com a duração de 55 min. e 1 bar de pressão.

Após a realização da hidrólise ácida, procedeu-se à etapa da filtração sob vácuo. Devido à toxicidade dos vapores ácidos gerados, esta etapa foi realizada no interior da hotte. Assim, imediatamente após a abertura do frasco *Schott* retirou-se uma amostra, com uma seringa de 2 ml e filtrou-se com um filtro de 0,2 µm para posterior análise no HPLC (*high-pressure liquid cromotography*) dos hidratos de carbono e potenciais

inibidores presentes (como ácidos carboxílicos, compostos furanos, etc.). Por fim, deu-se a separação da fração sólida da líquida, por vácuo, contendo esta última açúcares monoméricos provenientes das hemiceluloses, como a xilose e glucose, entre outros constituintes solúveis. O hidrolisado obtido (799 ml), com um pH de 1,12 foi armazenado a 4°C até ser submetido à etapa subsequente, a destoxificação.

3.3 Destoxificação dos hidrolisados

Para a remoção dos inibidores, prejudiciais ao crescimento microbiano, foram escolhidos dois métodos de destoxificação do hidrolisado obtido: a destoxificação com carvão ativado por meio de uma base forte e a destoxificação por membranas, nanofiltração, sendo ambos casos complementados com o método da evaporação sob vácuo para concentração do hidrolisado e eventual remoção de voláteis.

O hidrolisado inicial não destoxificado e sequencialmente destoxificado por membranas foi preparado previamente por um colega de laboratório, sendo, neste trabalho, concentrado o hidrolisado destoxificado por membranas com recurso a evaporação sob vácuo e feito o acerto de pH (do hidrolisado) antes do início dos ensaios fermentativos. O processo de destoxificação por membranas foi realizado com um caudal de 250 l/h, a uma pressão transmembranar de 20 bar e utilizada a membrana – NF270.

3.3.1 Preparação do carvão ativado alcalino

A preparação do carvão (Merck), com uma granulometria 100 – 400 mesh, requereu a lavagem inicial, de 100 g de carvão, com água destilada numa proporção de 1:6 (m/v). Este processo foi realizado com um agitador orbital, durante 1 h. a 150 r.p.m. e a 30±1°C. Posto isto, procedeu-se à separação do carvão sob vácuo, com papel de filtro de 125 mm, e seco à temperatura ambiente durante 24 h. A fração remanescente do carvão seco à temperatura ambiente foi de 80,3 g.

Seguidamente, procedeu-se à ativação do carvão remanescente através do contacto deste com uma solução básica de NaOH 5M, na proporção de 1:5 (m/v), sendo, de seguida, colocado num agitador orbital durante 1 hora a 30±1°C e a 150 rpm. Terminada

a agitação, procedeu-se à filtração sob vácuo, de forma a separar-se o carvão (com filtros Filter-Lab 1235) da solução básica. Secou-se o carvão ativado alcalino durante 12 h numa estufa a $80\pm 1^{\circ}\text{C}$. Terminado este processo, obteve-se 136,58g de carvão ativado alcalino.

3.3.2 Destoxificação com carvão ativado alcalino

No processo para a destoxificação do hidrolisado com pH 1,12 o carvão ativado foi adicionado progressivamente até se atingir os valores de pH desejados, ou seja, de 5,5 no caso da levedura *S. stipitis* e 7,0 no caso da bactéria *E. coli*, que correspondem ao pH ótimo de funcionamento quer da levedura quer da bactéria. Para a obtenção dos valores de pH anteriormente referidos, foram necessárias 45,9 e 53,7 gramas de carvão ativado, respetivamente. O volume de hidrolisado tratado, em cada um dos casos, foi 200 ml.

Após se terem atingido os valores de pH desejados, os hidrolisados foram mantidos durante uma hora sob agitação magnética à temperatura ambiente. Posto isto, os mesmos foram recolhidos com recurso a filtração sob vácuo e armazenado a 4°C . Obteve-se assim um volume final de 158ml para o hidrolisado a pH 5,5 e 115 ml para o de pH 7,0.

3.3.3 Concentração dos hidrolisados

Em virtude do decréscimo ocorrido na concentração das fontes de carbono presente nos hidrolisados, após a aplicação dos respetivos métodos de destoxificação, sujeitou-se estes ao processo de concentração por evaporação com recurso a um evaporador rotativo nas seguintes condições operacionais: 50°C e 10 r.p.m. Este processo permite também a remoção de alguns inibidores voláteis como o furfural.

Os hidrolisados sujeitos a concentração por evaporação, concretamente os hidrolisados destoxificados com carvão ativado a pH 5,5 e pH 7,0 e o hidrolisado destoxificado por membranas foram novamente analisados com recurso ao HPLC por forma a aferir-se a composição final dos açúcares bem como de inibidores com que se iniciaria os ensaios de fermentação. As amostras foram conservadas, a 4°C para posterior bioconversão dos hidrolisados destoxificados com carvão ativado alcalino bem como os

hidrolisados destoxificados por membrana. Antes de utilizar estes hidrolisados em fermentações ajustou-se o seu pH a 5,5 e 7,2 de acordo com o microrganismo a usar.

3.4 Microrganismos

3.4.1 *Escherichia coli*

A bactéria etanologénica *Escherichia coli* MSO4 foi desenvolvida, pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade Nacional Autónoma do México. A estirpe MSO4 foi evoluída geneticamente para tolerar ácido acético e metabolizar tanto a glucose como a xilose para a produção de etanol. A estirpe foi conservada em glicerol e congelada a -70 °C.

3.4.2 *Scheffersomyces stipitis*

A levedura *S. stipitis* CBS5773 foi fornecida gentilmente pelo Laboratório Nacional de Energia e Geologia e obtida a partir da Coleção de Culturas deste Laboratório. Esta estirpe consegue metabolizar a glucose e xilose e fazer fermentação etanólica. A levedura foi conservada em glicerol e congelada a -70°C.

3.4.3 Esterilização e assepsia

Todos os materiais e soluções foram esterilizados em autoclave a 121°C, a 1 atmosfera e durante 20 min., excetuando-se as soluções *stock* de alguns nutrientes que foram esterilizadas por filtração (filtro poro 0,2 µm). Por sua vez, todos os procedimentos foram realizados no interior da câmara de fluxo laminar, nomeadamente o processo de inoculação dos meios de manutenção sólidos e dos meios líquidos.

3.5 Meios de cultura

Os meios sólidos preparados para o crescimento em placa da *E. coli* e da *S. sitipis* foram, Luria-Bertani Broth (LB) (Merck®) e Yeast Medium of Peptone (YMP), respetivamente.

3.5.1 Meio sólido de manutenção LB

O meio de manutenção Luria-Bertani Broth (LB) sólido (com uma composição específica conhecida 10,0 g/L de triptona; 5,0 de extrato de levedura g/L e 10,0 de cloreto de sódio g/L) foi preparado com uma concentração de 20,0 g/L com água destilada e suplementado na seguinte razão composicional: 20,0 g/L de xilose (Sigma-Aldrich®), 30,0 mg/L de monossulfato de kanamicina (Duchefa-Biochemie®) e, por fim, 15,0 g/L de agar (Sigma-Aldrich®). O meio de manutenção foi preparado em três soluções separadas: a primeira contendo a solução LB e o agar, a segunda contendo a solução de xilose (autoclavadas durante 15 min. a 121°C) e a terceira contendo a solução de monossulfato de kanamicina. O monossulfato de kanamicina foi esterilizado por filtração e adicionado à primeira solução no interior da câmara de fluxo laminar, perfazendo assim o meio de manutenção sólido nas condições supracitadas

3.5.2 Meio sólido de manutenção YMP

O meio sólido de manutenção YMP foi preparado em água destilada com a composição seguinte: 3,0 g/L de extrato de levedura (Merck®); 3,0 g/L extrato de malte (Merck®); 5,0 g/L peptona (Fluka®); 10 g/l de xilose (Sigma-Aldrich®) e 15 g/L de agar (Sigma-Aldrich®). Este meio também foi preparado separadamente, ou seja, com a solução de xilose à parte.

3.5.3 Meio líquido para *Escherichia coli*

O meio líquido foi preparado em água destilada com a seguinte composição: 20 g/L de LB broth (Merck®); 50 g/L de carbonato de cálcio (Normapur®); 13,4 g/L de xilose (Sigma-Aldrich®); 0,3 g/L de arabinose (Sigma-Aldrich®) e 3,3 g/L de glucose

(Normapur®). De modo a evitar a precipitação de sais e a degradação de açúcares durante a esterilização, o meio foi realizado em três soluções distintas: uma solução contendo o LB broth; outra contendo a solução de carbonato de cálcio e outra contendo a xilose, glucose e arabinose.

Trabalhou-se com esta composição do meio líquido para igualar as concentrações de açúcares do hidrolisado destoxificado com carvão ativado até atingir-se o pH 7,0. Por outro lado, fez-se a inserção de carbonato de cálcio no meio líquido LB para ambientar a levedura e permitir estabilizar o pH, aquando da fermentação, favorecendo o seu crescimento.

3.5.4 Meio líquido para *Sheffersomyces stipitis*

O meio líquido YMP foi preparado com o dobro da concentração de açúcares do licor destoxificado com carvão ativado e corrigido a pH 5,5. Assim sendo a sua composição foi a seguinte: 3,0 g/L de extrato de levedura (Merck®); 3,0 g/L extrato de malte (Merck®); 5,0 g/L peptona (Fluka®); 27,5 g/L de xilose (Sigma-Aldrich®); 6,9 g/L de glucose (Normapur®). Este meio também foi preparado em soluções distintas, uma solução contendo o extrato de levedura, o extrato de malte e a peptona e outra contendo a glucose, xilose e a arabinose. Estas soluções foram ajustadas a pH 5,5.

3.6 Preparação dos inóculos

Os inóculos foram preparados através da transferência de uma colónia de uma população da estirpe da bactéria *E. coli* MSO4 e da levedura *S. stipitis* CBS 5773 do meio de manutenção sólido para 100 ml de meio líquido respetivo em Erlenmeyer de 250 ml com rolhão de algodão, seguido de incubação orbital a 37,0 °C a 200 r.p.m para o caso da bactéria e 30 °C a 150 r.p.m para o caso da levedura. Ambos os inóculos foram realizados em duplicado.

Ao fim de 12 horas de incubação e considerando o comprimento de onda usado para a bactéria de 550 nm e 600 nm para a levedura, determinou-se o valor de absorvância do

inóculo, calculando o volume de inóculo necessário para se obter uma absorvância inicial inferior a 0,4. Para o caso de *E. coli*, obteve-se um valor de absorvância do inóculo de 0,290 com a cultura diluída na proporção de 1:20. Já no caso de levedura, obteve-se um valor de absorvância do inóculo de 0,255 com a cultura diluída também na proporção de 1:20. Posto isto por forma a respeitar as condições supracitadas, adicionou-se o volume adequado de inóculo.

Assim, para a bactéria obteve-se um volume de inóculo de 2,73 ml e 3,125 ml para a levedura. Estes volumes foram primeiramente centrifugados, em tubo *falcon*, separando-se a suspensão celular do sobrenadante. Seguidamente acrescentou-se 5 ml de NaCl a 0,9 % (m/m) às células depositadas no *falcon* e centrifugou-se novamente, desprezando, de seguida, o sobrenadante. Posto isto, adicionou-se 5 ml de meio a cada um dos meios de fermentação (4 em duplicado, quer para a bactéria quer para a levedura) ao respetivo *falcon* que continha o pellet da biomassa, homogeneizando-os e por fim adicionou-se a solução homogeneizada a cada fermentação.

3.6.1 Fermentações

3.6.1.1 *Escherichia coli*

Foram realizadas quatro fermentações em Erlenmeyer de 250 ml com um volume de trabalho de 45 ml, suplementadas, com 50 g/L de carbonato de cálcio e 20 g/L de LB, sendo uma destas fermentações de controlo realizado em meio sintético complexo LB. As fermentações, realizadas em duplicado, foram respetivamente: (a) meio sintético complexo LB broth conforme descrito em 3.5.3.; (b) hidrolisado destoxificado com carvão ativado a pH 7 e evaporado; (c) hidrolisado destoxificado por membranas e evaporado; (d) hidrolisado não destoxificado e evaporado. Os referidos meios de fermentação foram inoculados como indicado anteriormente. Após a inoculação foi lido no imediato a densidade ótica a 550 nm da cultura correspondendo ao instante inicial do crescimento. Posto isto, colocou-se no agitador orbital imediatamente os ensaios fermentativos a $37,0 \pm 0,5$ °C e a 200 r.p.m., sendo recolhidas amostras de 3 ml ao longo do tempo por forma a monitorizar-se a biomassa bacteriana, o pH e a composição por

HPLC, exceto no ensaio (b) no qual não foi possível medir a absorvância devido à insuficiência de volume de hidrolisado para realizar as respectivas diluições e no ensaio (c) uma vez ter ocorrido interferência, na leitura dos valores de absorvância, por causa da tonalidade escura do hidrolisado.

3.6.1.2 *Scheffersomyces stipitis*

Realizaram-se quatro fermentações (em duplicado) em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de volume de trabalho. Tal como no caso supracitado, uma destas fermentações foi de controlo, realizada em meio sintético definido. As fermentações realizadas com os hidrolisados foram suplementadas nas seguintes condições: com 3,0 g/L de extrato de levedura (Merck®); 3,0 g/L extrato de malte (Merck®) e 5,0 g/L peptona (Fluka®). Assim as fermentações realizadas, em duplicado foram: (a) meio cultura sintético definido YMP com concentração de açúcares igual ao licor destoxificado com carvão ativado a pH 5,5 e evaporado; (b) hidrolisado destoxificado com carvão ativado a pH 5,5 e evaporado; (c) hidrolisado destoxificado por membranas e evaporado; (d) hidrolisado não destoxificado e evaporado. Todos os ensaios foram preparados em soluções separadas e ajustados a pH 5,5. Após a inoculação, foi lida no imediato a densidade ótica a 600 nm da cultura correspondendo ao instante inicial do crescimento. A incubação foi a 30°C e 150 r.p.m. e a amostragem fez-se de acordo com o procedimento descrito acima.

As fermentações realizadas com hidrolisados estão sintetizadas na figura 8, com a respetiva letra a indicar cada um dos hidrolisados, por forma a facilitar a discussão posterior dos resultados obtidos.

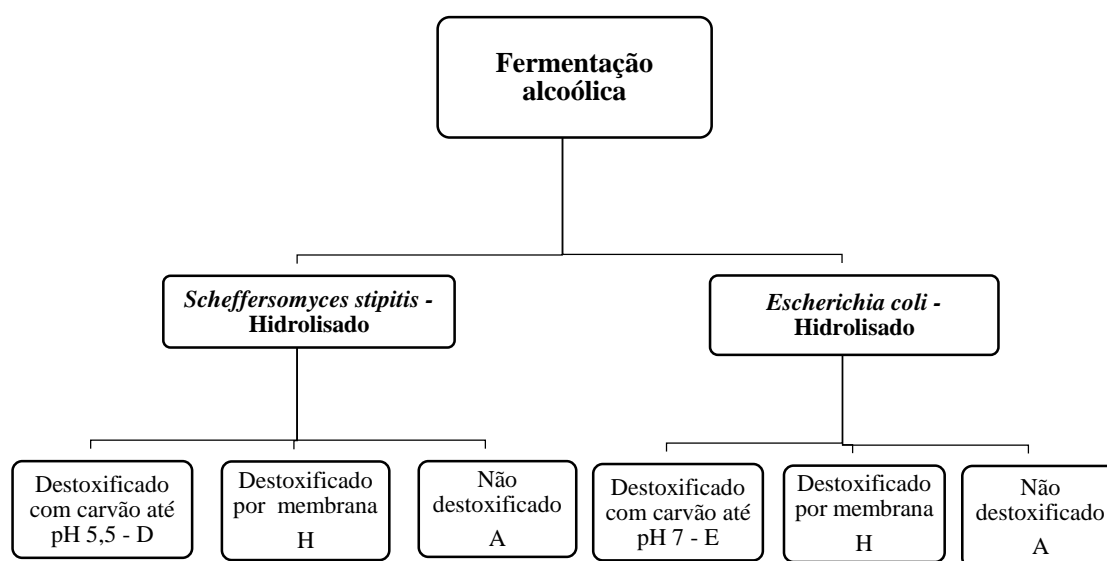


Figura 8 - Hidrolisados obtidos para as fermentações em Erlenmeyer

Para além das fermentações com os hidrolisados obtidos, foi ainda realizada a fermentação em meio sintético, para controle de crescimento e produção de etanol de cada um dos microrganismos. Assim, como descrito anteriormente, no caso da bactéria foi realizada a fermentação em meio sintético LB e no caso da levedura em meio sintético YMP, perfazendo um total de 8 fermentações em duplicado.

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Determinação da humidade

Primeiramente, foi necessário tarar-se os cadinhos durante 12 horas numa estufa a 105 °C seguindo-se o arrefecimento destes num exsiccador para pesagem numa balança analítica. De seguida adicionou-se, aproximadamente, 1 g de matéria-prima (cardo a 40-60 mesh) a cada cadinho e colocaram-se estes em estufa a 105 °C durante 16 h. Depois foram transferidos para o exsiccador até a sua temperatura estabilizar sendo, por fim, novamente pesados e aferido o peso seco da biomassa. Os ensaios para a determinação da humidade foram realizados em duplicado.

3.7.2 Composição dos hidrolisados

A composição dos hidrolisados baseou-se no protocolo estabelecido pelo NREL (42623-NREL Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples).

A análise quantitativa de D-glucose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido láctico, 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural e etanol presente nos hidrolisados, foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com o sistema LaChrome Merck Hitachi incluindo, um módulo interface L-7000, *software* D HSM-7000, um amostrador automático L-7200, uma bomba L-7100 que impunha um caudal de eluente de 0,6 ml/min de H₂SO₄ (0,005M) como fase móvel – utilizando uma coluna de troca catiónica, Aminex HPX-87H (Bio-rad, E.U.A.) de 300 × 7,8 mm, um forno L-7350.

Prepararam-se as amostras para o HPLC sendo previamente centrifugadas a 11000 rpm durante 5 min. e a 4°C para separação da biomassa do sobrenadante (fase aquosa para análise). O sobrenadante foi filtrado, para viais, com recurso a seringas de 2 ml e filtros de poro de 0,22 µm, sendo seguidamente injetado 5 µl de filtrado no sistema HPLC, com a temperatura do forno a 50°C e um tempo de corrida de 55 min.

A quantificação dos açúcares, ácidos alifáticos e etanol, mencionados anteriormente, foi feita utilizando um detetor de índice de refração (IR) L-7490, enquanto a quantificação do HMF e do furfural foi feita com recurso a um detetor ultravioleta/visível L-7420.

A concentração de todos os compostos analisados foi determinada com base nas respetivas curvas de calibração de cada composto, curvas estas que foram realizadas a partir de soluções padrão a diferentes concentrações por forma a abranger a área de pico do composto em questão.

3.8 Parâmetros cinéticos e estequiométricos

A taxa específica de crescimento máxima, $\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹) foi obtida na fase exponencial do crescimento celular, da levedura e da bactéria, através do declive da reta \ln (Biomassa) em função do tempo. A concentração da biomassa foi calculada através da expressão do

valor de biomassa seca por unidade de absorvância, descrito por Vargas-Tal *et al.* (2015), e dos valores de absorvância medidos ao longo da fermentação.

A taxa volumétrica de consumo de substrato, $r_{\text{substrato}}$ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), foi calculada através da seguinte equação:

Equação (3)

$$-rs = \frac{\text{Concentração substrato}_f - \text{Concentração substrato}_i}{\text{tempo}_f - \text{tempo}_i}$$

Onde os substratos são, respetivamente: glucose; xilose e arabinose. No cálculo das taxas volumétricas de consumo destes substratos considerou-se o tempo final quando se dava a exaustão completa de cada monossacárido.

As taxas volumétricas de formação de produtos, r_{produto} ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), foram calculadas através da seguinte equação:

Equação (4)

$$rp = \frac{\text{Concentração produto}_f - \text{Concentração produto}_i}{\text{tempo}_f - \text{tempo}_i}$$

Onde os produtos finais são, respetivamente: etanol e ácido acético no caso da bactéria e etanol no caso levedura. Para a taxa volumétrica de formação de produtos foi considerado o tempo final quando se dava a produção máxima destes.

O rendimento em etanol, $Y_{\text{etanol/substrato}}$ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), foi calculado com recurso à seguinte equação:

Equação (5)

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Concentração Produto}_f - \text{Concentração Produto}_i}{\text{Concentração Substrato}_i - \text{Concentração Substrato}_f}$$

Para o cálculo do rendimento em etanol da equação 5, os substratos considerados foram igualmente a glucose, a xilose e a arabinose.

Tendo em consideração o rendimento teórico em etanol ser de 0,51 g/g, calculou-se a eficiência de conversão (%) com base na equação 6.

Equação (6)

$$\textit{Eficiência de conversão} (\%) = \frac{Yp/s}{0,51} \times 100$$

Por último calculou-se a produtividade máxima de etanol, determinada no tempo correspondente à concentração máxima de etanol obtida nas fermentações, utilizando a equação 7.

Equação (7)

$$P_{\text{máx}} = \frac{\textit{Concentração de etanol}}{\textit{tempo correspondente ao máx de etanol}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição do hidrolisado do pré-tratamento

Para se solubilizarem as hemiceluloses da biomassa do cardo realizou-se a sua hidrólise ácida fraca a fim de se obterem açúcares para a fermentação a bioetanol.

Após a realização da hidrólise ácida diluída no tratamento do cardo, nas condições anteriormente descritas (secção 3.2.) procedeu-se à análise por HPLC da composição dos hidrolisados líquidos para determinação da concentração dos seus componentes.

Na tabela 7 apresenta-se a composição da fração líquida, resultante do pré-tratamento aplicado. Esta é constituída pelos monómeros das hemiceluloses como a glucose, a xilose e a arabinose, bem como por compostos tradicionalmente considerados inibidores como o hidroximetilfurfural e o furfural, resultantes da degradação dos açúcares, e ainda por ácidos carboxílicos (acético, levulínico e fórmico). Tal como reportado por Zhang *et al.* (2015), verifica-se igualmente na tabela 7 que os dois inibidores mais abundantes no hidrolisado obtido são o ácido acético e o furfural, com uma concentração de 3,82 g/L e 4,88 g/L respetivamente.

Tabela 7 - Composição do hidrolisado de cardo após o pré-tratamento - concentração de açúcares na forma monomérica e inibidores

| <i>Composto</i> | <i>Concentração (g/L)</i> |
|------------------|---------------------------|
| Glucose | 2,58 |
| Xilose | 12,19 |
| Arabinose | 0,75 |
| Ácido Acético | 3,82 |
| Ácido Levulínico | 0,47 |
| Ácido Fórmico | 0,56 |
| Furfural | 4,88 |
| HMF | 0,75 |

A maior concentração de xilose no hidrolisado é perfeitamente natural, uma vez que se trata do monossacarídeo maioritário nas hemiceluloses.

Ballesteros *et al.*, (2008) conseguiram um rendimento máximo de xilose de 13,5 g/100 de cardo, após aplicação de um pré-tratamento com ácido sulfúrico com uma concentração de 0,1-0,2 % (m/m) e uma temperatura de 180 °C. No presente estudo, nas condições de 121 °C e uma concentração de ácido sulfúrico superior, 6,7 % (m/m), conseguiu-se um rendimento de xilose de 12,19 g/50 de cardo, ou seja, obteve-se uma maior eficiência na hidrólise seletiva das hemiceluloses com o aumento de concentração de H₂SO₄.

4.2. Efeito dos processos de destoxificação na composição dos hidrolisados

4.2.1. Destoxificação com carvão ativado

Nesta fase para além do hidrolisado produzido (tabela 7) juntou-se também hidrolisado previamente obtido, nas mesmas condições e armazenado no laboratório a fim de se obter um maior volume inicial (tabela 8). Uma vez que os hidrolisados, para além dos monossacáridos, continham vários compostos já reportados como inibidores de fermentações, usou-se carvão ativado para se tentar eliminar os inibidores por adsorção. Procedeu-se à destoxificação do hidrolisado com carvão ativado por NaOH 5M, até se atingir o pH 5,5 ou o pH 7,0, por forma a realizarem-se posteriormente ensaios fermentativos com a levedura *S. stipitis* e a bactéria *E. coli*, respetivamente.

Tabela 8 Composição dos monossacáridos e inibidores presentes nos hidrolisados - não destoxificados e destoxificados com carvão ativado.

| <i>Hidrolisado</i> | <i>Composição dos hidrolisados (g/L)</i> | | | | | | | |
|---|--|------------|------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|------------|
| | Glu | Xil | Ara | Ác. Levul. | Ác. Acético | Ác.* Fórmico | Furfural | HMF |
| A - Não destoxificado | 2,57 | 11,48 | 1,02 | 0,07 | 4,48 | 0,21 | 2,19 | 0,04 |
| B - Destoxificado com carvão - pH 5,5 | 2,36 | 9,68 | 0,47 | 0,22 | 3,27 | 2,71 | 0,05 | 0,01 |
| C - Destoxificado com carvão - pH 7 | 2,29 | 9,28 | 0,53 | 0,41 | 3,92 | 3,25 | 0,00 | 0,00 |
| D - Destoxi. com carvão e evaporado - pH 5,5 | 3,44 | 13,71 | 0,85 | 0,28 | 4,50 | 3,93 | 0,00 | 0,01 |
| E - Destoxi. com carvão e evaporado - pH 7 | 3,27 | 13,37 | 0,75 | 0,56 | 5,79 | 4,79 | 0,00 | 0,01 |

* Quantificação com pouca resolução uma vez que havia sobreposição do pico do ácido fórmico com outro com uma área muito maior.

Na tabela 8, pode-se verificar a composição dos hidrolisados, obtidos sequencialmente a partir do hidrolisado A (não destoxificado) até se proceder aos ensaios fermentativos. Assim, obteve-se a composição do hidrolisado após o pré-tratamento ácido - A, a composição do hidrolisado inicial com aplicação de carvão ativado com NaOH até o pH subir até 5,5 - B e um segundo até atingir-se o pH 7 - C. Por fim, a composição destes hidrolisados, concentrados por evaporação sob vácuo, D e E de modo a que xilose tivesse uma concentração igual ou superior à inicial, ou seja, 11,48 g/L. No que concerne à composição do hidrolisado A, como seria de esperar, a xilose foi a maior fonte de açúcar monomérico (11,48 g/L), e como visto na bibliografia, o furfural (2,19 g/l) e o ácido acético (4,48 g/L) os inibidores em maior concentração.

Numa primeira análise a B e C, constata-se a eficácia do tratamento com carvão ativado na remoção por adsorção dos compostos furanos, furfural e hidroximetilfurfural, sendo que na destoxificação a pH 7 a sua remoção foi total. Em sentido inverso ficou evidenciada a ineficácia deste tratamento na remoção dos ácidos carboxílicos. A concentração de ácido acético diminuiu pouco e certamente não houve remoção do ácido fórmico.

Por outro lado, e como expectável, verificou-se ainda uma ligeira adsorção de monossacáridos, tendo a concentração de glucose, xilose e arabinose baixado comparativamente ao hidrolisado inicial.

Assim, os dois hidrolisados destoxificados com carvão ativado B e C foram evaporados sob vácuo como o intuito de repor-se a concentração de açúcares, concretamente a xilose cuja concentração final em D e E foi de 13,7 g/L e 13,4 g/L, respetivamente.

4.2.2. Destoxificação com membranas

Na tabela 9 apresentam-se os resultados da composição do hidrolisado destoxificado por membranas de nanofiltração. Este hidrolisado e respetiva destoxificação foram previamente feitos no laboratório por um colega. O hidrolisado (H) foi posteriormente concentrado e usado, neste trabalho, nas fermentações a bioetanol.

Tabela 9 - Composição dos monossacáridos e inibidores presentes nos hidrolisados - não destoxificado e destoxificado por membranas.

| <i>Hidrolisado</i> | <i>Composição dos hidrolisados (g/L)</i> | | | | | | | |
|--|--|------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------|------------|
| | Glu | Xil | Ara | Ác. Levul. | Ác. Acético | Ác. Fórmico | Furfural | HMF |
| F - Não destoxificado | 2,47 | 11,81 | 0,193 | 0,26 | 3,73 | 0,386 | 2,02 | 1,411 |
| G - Destoxificado por membranas | 2,47 | 8,13 | 0,71 | 0,04 | 0,42 | 0,00 | 0,10 | 0,01 |
| H - Destoxificado por membranas e evaporado | 3,43 | 11,24 | 0,81 | 0,04 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |

Observando a tabela 9 verifica-se que neste processo de filtração com membranas e posterior evaporação se fez a remoção praticamente total dos furanos e dos ácidos orgânicos. Este tipo de destoxificação é altamente eficaz não só na remoção de compostos furanos como também dos ácidos carboxílicos, concluindo-se que este método apresenta uma elevada capacidade de remoção de inibidores de baixo peso molecular, sendo assim um método mais eficaz que o de destoxificação com carvão

ativado. No entanto, verifica-se também uma maior perda de monossacáridos quando comparado com a destoxificação com carvão, na qual a xilose tinha uma concentração média de 9,48 g/L, enquanto nesta destoxificação o seu valor foi de 8,13 g/L.

Tal como no caso anterior, em função do decréscimo da concentração de açúcares, o hidrolisado destoxificado por membrana foi concentrado com recurso a evaporação sob vácuo, sendo a xilose o monómero tido em consideração para a concentração final pretendida do hidrolisado evaporado, tendo tido um valor final de concentração de 11,24 g/L. A concentração por evaporação permitiu também a destoxificação do hidrolisado, tendo em conta a volatilidade de alguns inibidores presentes, tendo diminuído a concentração de ácido acético para valores irrisórios (0,05 g/L) e eliminado por completo a concentração do furfural.

Finalizadas as etapas de destoxificação obtiveram-se todos os hidrolisados a serem fermentados na etapa subsequente, a fermentação.

4.3. Fermentações

Realizou-se fermentação alcoólica em Erlenmeyer dos diferentes hidrolisados com a levedura *S. stipitis* CBS 5773 e ainda com uma bactéria geneticamente modificada *E. coli* MSO4 para este fim, com objetivo de escolher o melhor microrganismo para a produção de bioetanol com estes hidrolisados. As condições eram microaerofílicas para se promover o metabolismo fermentativo e não o metabolismo de crescimento.

4.3.1. Ensaio em Erlenmeyer com *Escherichia coli*

Realizaram-se 3 fermentações, em duplicado, com a bactéria *E. coli* e os hidrolisados de cardo preparados e ainda 1 ensaio controlo com meio sintético LB. Nestes ensaios, considerando que nas fermentações realizadas em Erlenmeyers não existe a possibilidade de controlo do pH ao longo do tempo, usou-se carbonato de cálcio (50 g/L) com o intuito de manter o pH o mais estável possível.

4.3.1.1. Ensaio em Erlenmeyer com meio sintético LB

O meio sintético foi preparado de modo a que as fontes de carbono, os monossacáridos tivessem exatamente a mesma concentração obtida no hidrolisado E, (tabela 8). Foi assim preparado com glucose a 3,27 g/L, xilose a 13,37 g/L e arabinose a 0,75 g/L.

Na figura 9 apresentam-se os resultados da fermentação do meio sintético e verifica-se que houve consumo das principais fontes de açúcar, nomeadamente da xilose e glucose, até às 24 horas, sendo que a exaustão da glucose ocorreu por volta das 5 horas de fermentação.

Verifica-se no perfil de consumo destes dois açúcares que o consumo da xilose só ocorreu após a exaustão da glucose. Este é um comportamento esperado tanto na *E. coli* como em outras bactérias, devido ao fenómeno designado de repressão catabólica do carbono, no qual a presença da glucose impede o uso de outras fontes de carbono (Bren *et al*; 2016).

Outro fato observável na figura 9 é a ausência da fase lag, uma vez que foram utilizados inóculos cultivados em um meio com composição igual ao ensaio de fermentação, indicando por um lado a adaptação muito rápida da bactéria ao meio sintético LB e por outro lado uma elevada percentagem de células viáveis no inóculo.

Verificou-se ainda a ausência de outra fase lag entre o término no consumo da glucose e o início do consumo da xilose muito possivelmente devido ao fato da do inóculo da bactéria ter sido crescido com concentração de xilose igual ao meio sintético LB.

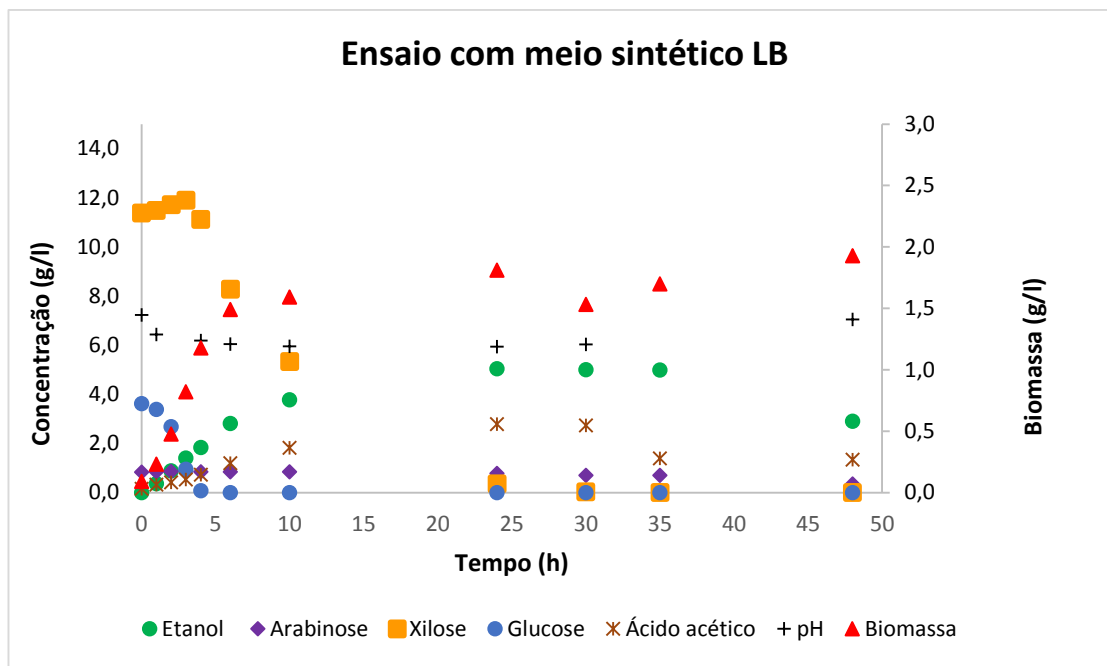


Figura 9 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, ácido acético, biomassa e perfil do pH ao longo do tempo de fermentação

No que concerne à produção de etanol, o seu valor máximo (5,04 g/L) ocorreu por volta das 24 horas, período correspondente à exaustão da xilose. O resultado está de acordo com o esperado, uma vez que esta bactéria foi geneticamente modificada para poder realizar a fermentação alcoólica. Neste período verificou-se também a concentração máxima (2,78 g/L) de ácido acético, que além do etanol é também um produto da fermentação desta bactéria que, como afirmado por Gírio *et al.* (2010), reduz o rendimento em etanol produzido. Após as 24 horas de fermentação, o crescimento da bactéria terminou devido à falta de nutrientes e, subsequentemente, a concentração de etanol diminui, provavelmente por ter sido consumido para a manutenção da biomassa.

O valor de pH inicialmente próximo do 7 baixou nas primeiras 5h horas, simultaneamente com a produção de etanol. De fato na fermentação alcoólica produz-se simultaneamente uma molécula de CO₂ tal como referido na secção 2.6. O CO₂ em solução estabelece um equilíbrio com o ácido carbónico e o pH baixa. O valor mais baixo do pH (5,94) ocorreu às 24h, altura da produção máxima de etanol e ácido acético. Após este período e com o consumo do ácido acético o pH voltou a subir até atingir o valor final de 7,05. Como referido anteriormente, adicionou-se o carbonato de cálcio por forma

a proporcionar um efeito tampão ao meio durante o ensaio, minimizando as flutuações no valor de pH. No entanto este efeito pode não ter sido suficiente, principalmente porque foram produzidos ácidos. Assim por forma a conseguir-se um pH sem variações neste ensaio de fermentação, o mesmo teria de ser efetuado por um sistema de adição automática de uma solução básica.

Na tabela 10 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos na fermentação com o meio sintético de controlo LB. Primeiramente verifica-se a adaptabilidade ao meio sintético por parte da bactéria visto ter tido um crescimento celular acentuado, tendo uma $\mu_{\text{máx}}$ de $0,64 \text{ h}^{-1}$. As taxas volumétricas de consumo de substrato, ou seja, r_{glucose} , r_{xilose} e a $r_{\text{arabinose}}$ foram, respetivamente, de $0,60 \text{ g/L}$, $0,33 \text{ g/L}$ e $0,01 \text{ g/L}$.

Assim a r_{etanol} foi de $0,21 \text{ g/L}$ e a $r_{\text{ácido acético}}$ de $0,11 \text{ g/L}$, tendo-se obtido um rendimento em etanol ($Y_{\text{etanol/substrato}}$) $0,34 \text{ g/g}$, correspondente a uma eficiência de conversão de $67,3 \%$, isto considerando o rendimento teórico de $0,51 \text{ g/g}$ para glucose, a xilose e a arabinose. Por fim o etanol máximo obtido, no presente ensaio, pela bactéria *E. coli* MSO4 foi de $5,04 \text{ g/L}$, o que correspondeu a uma produtividade máxima de $0,21 \text{ g/L.h}$.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos com o meio sintético LB

| <i>Parâmetros</i> | <i>Ensaio com meio sintético LB</i> |
|---|---|
| $\mu_{\text{max}} (\text{h}^{-1})$ | 0,64 |
| $r_{\text{glucose}} (\text{g/L.h})$ | 0,60 |
| $r_{\text{xilose}} (\text{g/L.h})$ | 0,33 |
| $r_{\text{arabinose}} (\text{g/L.h})$ | 0,01 |
| $r_{\text{etanol}} (\text{g/L.h})$ | 0,21 |
| $r_{\text{ác. Acético}} (\text{g/L.h})$ | 0,11 |
| $Y_{\text{etanol/substrato}} (\text{g/g})$ | 0,34 |
| $[\text{Etanol}]_{\text{máx}} (\text{g/L})$ | 5,04 |
| Eficiência de Conversão (%) | 67,3 |
| Produtividade Máxima (g/L.h) | 0,21 |

4.3.1.2. Ensaio em Erlenmeyer com hidrolisado destoxificado com carvão ativado

Os resultados do ensaio de fermentação realizado com hidrolisado E (destoxificado com carvão ativado alcalino e concentrado com evaporação sob vácuo) encontram-se na figura 10. Verifica-se que a bactéria não conseguiu fazer fermentação pois certamente não estavam reunidas as condições necessárias para a atividade metabólica com o respetivo consumo de açúcares e formação de etanol, contrariamente ao verificado no meio sintético LB.

Uma possibilidade para a bactéria ter sido inibida pode derivar da ineficácia do método de destoxificação, anteriormente referida, na remoção de inibidores como o ácido acético e inclusive o ácido fórmico, que se encontravam com concentrações consideráveis (5,79 g/L e 4,79 g/L, respetivamente) no ensaio de fermentação (visível na hidrolisado E da tabela 8). Apesar de esta estirpe (MSO4) ser tolerante ao ácido acético, Fernández-Sandoval *et al.* (2012) referiu que esta estirpe em concreto mostrava uma redução linear do crescimento desta com o aumento da concentração de ácido acético, além de verificar também uma menor capacidade de tolerância ao referido ácido em condições de limitação de oxigénio, mostrando assim que a disponibilidade de oxigénio para além de ter um papel importante na produção de etanol, contribui também para a tolerância da bactéria a um meio adverso, ou seja, com alguma concentração de ácidos fracos como os supracitados. Através da figura 10 verifica-se que o pH inicial era extremamente elevado, 8,2. Apesar do hidrolisado E ter sido acertado a pH 7,2, ao preparar este ensaio, para além do hidrolisado e meio LB juntou-se também carbonato de cálcio como já referido. Possivelmente este hidrolisado E, destoxificado com carvão ativado por uma base forte, foi mais sensível à introdução do carbonato de cálcio a 50 g/L, e consequentemente elevou o pH a 8,2. Certamente esta foi a razão que impossibilitou o funcionamento da bactéria motivo pelo qual nada aconteceu durante o ensaio

Com o pH distante da neutralidade, requerida para o funcionamento desta bactéria e juntando a não remoção de ácidos carboxílicos com este tipo de destoxificação, explica-se a não obtenção de resultados na presente fermentação.

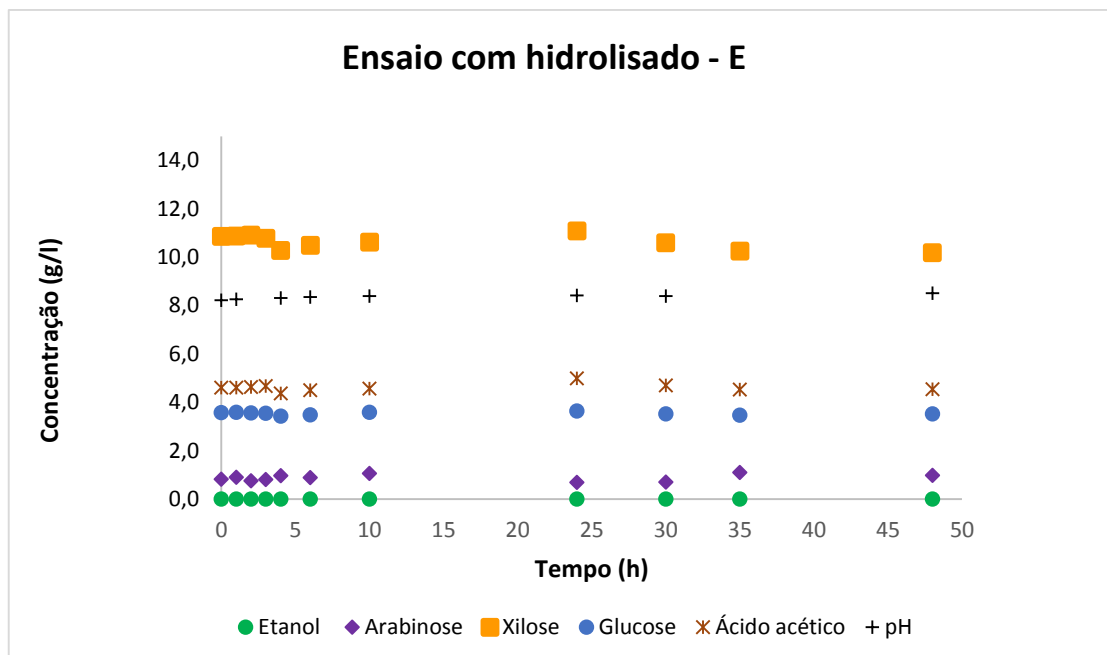


Figura 10 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, ácido acético e perfil de pH ao longo do tempo da fermentação

4.3.1.3. Ensaio em Erlenmeyer com hidrolisado destoxificado por membranas

Na figura 11 apresentam-se os resultados do ensaio com o hidrolisado H (tabela 9).

O hidrolisado H impôs uma tonalidade muito escura ao meio de fermentação não tendo sido possível medir com rigor a absorvância, a comprimento de onda de 550 nm, ou seja não tendo sido possível avaliar a concentração celular, como nos ensaios anteriores.

O consumo de monossacáridos do hidrolisado, neste caso da glucose, iniciou-se sensivelmente às 3 horas de fermentação. Comparativamente ao ensaio com o meio sintético LB, no qual a bactéria começou desde o instante inicial a consumir a referida fonte de carbono, a presente fermentação demorou um pouco mais a iniciar esse consumo. Provavelmente deveu-se à ambientação da bactéria às novas condições proporcionadas pelo hidrolisado.

Após as 3 horas iniciais de fermentação a bactéria consumiu a glucose, tendo-se esta extinguido por volta das 10 horas de fermentação. A xilose, como se esperava, foi consumida mais tardiamente que a glucose. A sua exaustão ocorreu por volta das 24 horas de fermentação, tal como na fermentação com meio LB. Apesar de neste meio a bactéria demorar um pouco mais a iniciar o consumo de glucose, a partir do momento em que o fez a duração de consumo da glucose bem como da xilose foi aproximadamente o mesmo que o verificado no meio sintético LB.

A concentração máxima de etanol ocorreu quando se extinguiu a xilose, às 24 horas de fermentação tal como no ensaio com o meio sintético LB. A concentração máxima de etanol, atingida no referido período, foi de 7,16 g/L, sendo o maior valor obtido. Neste período verificou-se também a concentração máxima de ácido acético 1,72 g/L, valor inferior ao verificado na fermentação em meio sintético LB (2,78 g/L).

A disponibilidade de oxigénio em todas as fermentações foi igual pois o rácio entre o volume total e o volume útil foi sempre $5,0 V_{\text{total}}.V_{\text{útil}}^{-1}$. Deste modo o aumento da produção de etanol neste ensaio não está relacionado com uma menor disponibilidade de oxigénio. A verdade é que esta estirpe geneticamente modificada foi mais eficiente, no presente hidrolisado do que no meio sintético. Ela produziu menos ácido acético em favor da produção de etanol, o que está de acordo com o descrito por (Gírio *et al.* 2010) que afirma que a formação de produtos como ácido acético por parte desta bactéria diminui o rendimento de etanol produzido.

Outra possibilidade para o aumento da produção de etanol poderá ser derivado da composição diferenciada deste hidrolisado por possuir constituintes que favoreçam a ativação enzimática, nomeadamente a enzima Álcooldehidrogenase (ADH) para a formação de etanol.

Na presente fermentação o decréscimo da concentração de etanol foi de 7,16 g/L para 6,61 g/L. Este ligeiro decréscimo estará, apesar de não ter sido possível quantificar a biomassa bacteriana, estará ligado à manutenção dessa mesma biomassa, uma vez extinguidas as fontes de nutrientes. Por outro lado, contrariamente ao ensaio em meio sintético LB, não se verificou a reassimilação de ácido acético.

Nas condições do hidrolisado do presente ensaio, o perfil de pH mostrou um gama de valores (variou entre um mínimo de 6,12 e um valor máximo de 6,9) mais próximos da neutralidade, favorecendo assim o metabolismo da bactéria para a produção de etanol.

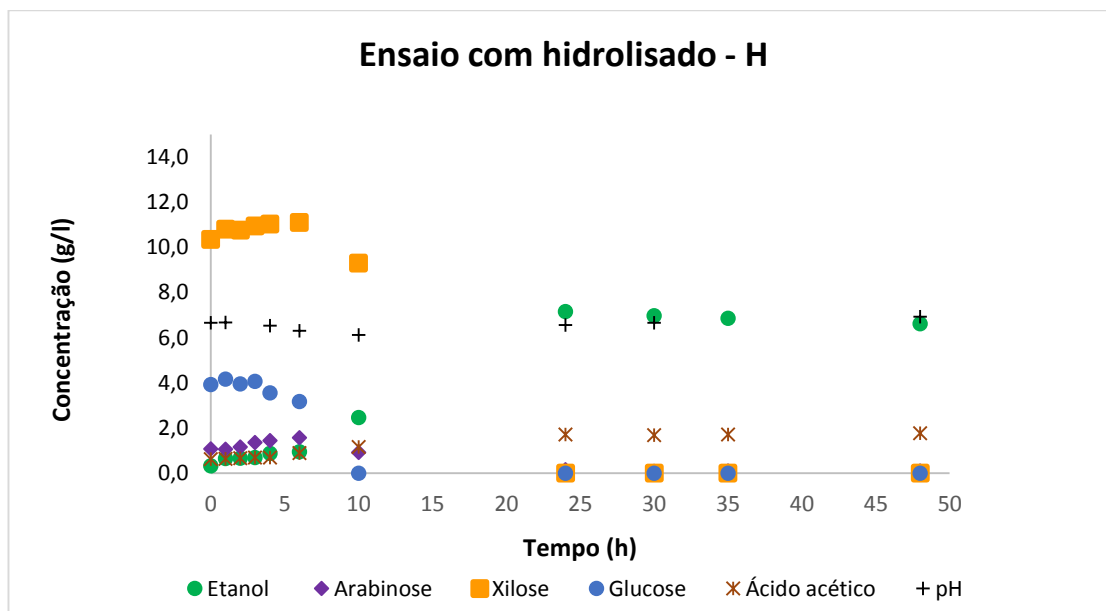


Figura 11 - Concentração de etanol, arabinose, glucose, ácido acético e perfil de pH ao longo do tempo de fermentação

Na tabela 11, são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos na fermentação com o hidrolisado H.

As taxas volumétricas de consumo de substrato, ou seja, r_{glucose} , r_{xilose} e $r_{\text{arabinose}}$ foram, respetivamente, de 0,39 g/L, 0,43 g/L e 0,02 g/L. Comparativamente ao meio sintético, verificou-se uma menor taxa volumétrica de consumo de glucose, uma vez que a bactéria neste ensaio demorou 3 h a iniciar o consumo desta fonte de carbono. Por sua vez, a partir do momento em que começou a consumir as fontes de carbono, rapidamente se verificou a exaustão da glucose e da xilose, o que se reflete na taxa de consumo da xilose superior, pois às 24 h de fermentação já se tinha extinguido por completo, enquanto na fermentação com meio sintético LB foi necessário um tempo ligeiramente superior no consumo da xilose apesar do consumo desta fonte se ter iniciado mais cedo no meio LB.

No que concerne à taxa volumétrica de formação de produtos, como analisado anteriormente, no presente ensaio verificou-se uma menor produção de ácido acético e consequentemente uma maior produção de etanol que se traduziu na r_{etanol} de 0,28 g/L e a $r_{\text{ácido acético}}$ de 0,05 g/L. Posto isto, foi obtido um rendimento em etanol ($Y_{\text{etanol/substrato}}$) de 0,45 g/g, correspondente a uma eficiência de conversão de 88,1 % do valor teórico (considerando o rendimento teórico de 0,51 g/g para glucose, a xilose e a arabinose), revelando assim uma conversão maioritária dos açúcares em etanol. Por fim, o etanol máximo obtido, no presente ensaio, pela bactéria *E. coli* MSO4 foi de 7,16 g/L, o que correspondeu a uma produtividade máxima de 0,30 g/L.h.

Esta mesma estirpe foi também utilizada por Jimenez *et al.* (2012), que testou a produção de etanol a partir hidrolisados lenhocelulósicos, com concentração de ácido sulfúrico para o pré-tratamento de 1, 2 e 4% (m/m) tendo conseguido uma eficiência de conversão de 95%, obtida ao cabo de 36 horas de fermentação. Isto poderá ser explicado devido ao fato da etapa fermentativa ter ocorrido a um pH 7 constante ao longo do tempo de fermentação uma vez que este ia sendo ajustado automaticamente, permitindo assim as condições ótimas (neutralidade) para o crescimento e atividade da bactéria.

Tabela 11- Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos com o hidrolisado destoxificado por membranas

| <i>Parâmetros</i> | <i>Ensaio com hidrolisado destoxificado c/ membranas</i> |
|--------------------------------------|--|
| r_{glucose} (g/L.h) | 0,39 |
| r_{xilose} (g/L.h) | 0,43 |
| $r_{\text{arabinose}}$ (g/L.h) | 0,02 |
| r_{etanol} (g/L.h) | 0,28 |
| $r_{\text{ác. Acético}}$ (g/L.h) | 0,05 |
| $Y_{\text{etanol/substrato}}$ (g/g) | 0,45 |
| $[\text{Etanol}]_{\text{máx}}$ (g/L) | 7,16 |
| Eficiência de Conversão (%) | 88,1 |
| Produtividade Máxima (g/L.h) | 0,30 |

Contrariamente ao tratamento com carvão ativado, o ensaio destoxificado com membranas e concentrado com evaporação sob vácuo, mostrou ser uma alternativa muito interessante para a produção de etanol. Como base na composição final do hidrolisado H (visível na tabela 9) verifica-se que esta destoxificação foi eficaz na remoção dos inibidores quantificados por HPLC, não apresentando assim constrangimentos a este nível para que a bactéria pudesse crescer e produzir etanol, contrariamente ao verificado no hidrolisado E (tabela 8).

4.3.1.4. Ensaio em Erlenmeyer com hidrolisado não destoxificado

A figura 12 mostra que o ensaio, realizado com hidrolisado sem ser sujeito a qualquer processo de destoxificação, não é viável para a produção de etanol.

A composição deste hidrolisado A (tabela 8), nomeadamente a elevada concentração de uma vasta gama de compostos inibitórios (furfural e ácido acético, entre outros), terá impossibilitado por completo o metabolismo de fermentação, não se verificando consequentemente o consumo de qualquer monossacárido e subsequente produção de etanol. Fica assim evidente a necessidade de aplicar-se um método de destoxificação eficaz na remoção dos inibidores tendo em vista a produção de etanol a partir deste tipo de hidrolisados e usando esta bactéria.

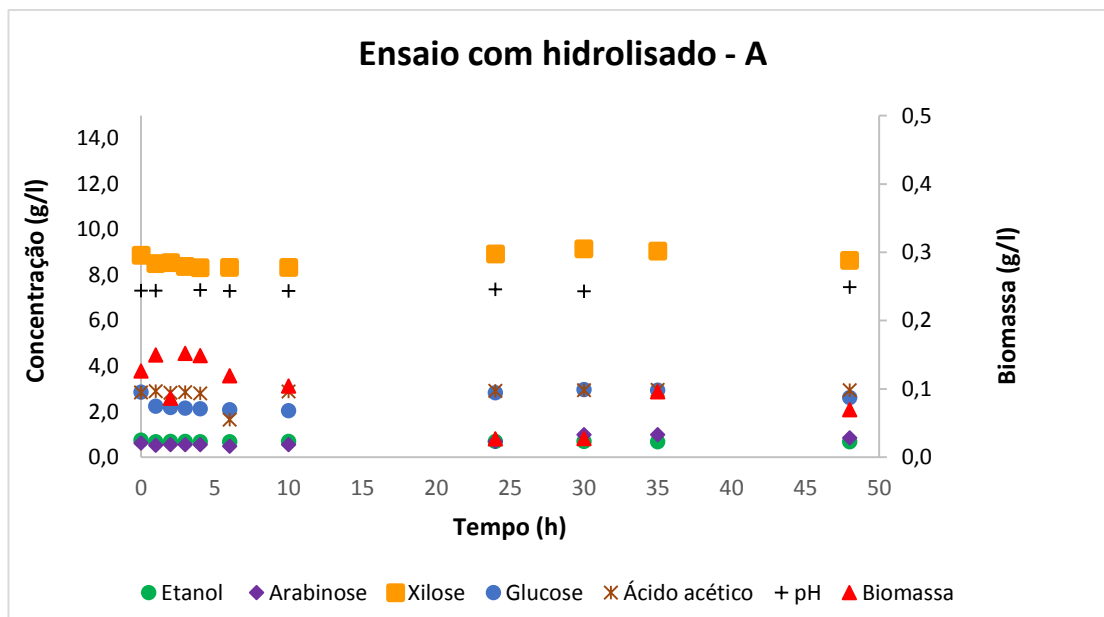


Figura 12 - Concentração de etanol, arabinose, glucose, ácido acético, biomassa e perfil de pH ao longo do tempo de fermentação

4.3.2. Ensaios em Erlenmeyer com *Scheffersomyces stipitis*

Realizaram-se 3 fermentações, em duplicado, com a levedura *S. stipitis* CBS 5773 e os hidrolisados de cardo preparados e ainda 1 ensaio controlo com meio sintético YMP. Nestas fermentações não foi utilizado carbonato de cálcio, uma vez que a referida levedura quase não produz ácidos.

4.3.2.1. Ensaio em Erlenmeyer com meio sintético YMP

A presente fermentação foi realizada em meio sintético YMP, ensaio controlo, preparado para que a concentração das fontes de carbono fosse similar à verificada no hidrolisado D (tabela 8).

Os resultados do ensaio em meio sintético YMP (figura 13) mostram desde o início da fermentação, o crescimento celular da levedura, resultante do consumo da glucose, visto o inóculo ter sido cultivado em meio líquido com composição semelhante. Este consumo inicial desta única fonte de carbono resulta da repressão, por parte da glucose,

de enzimas que são necessárias para metabolizar outros açúcares, como a xilose Slininger et al. (2011).

Quando a concentração da glucose já era mínima, por volta das 6 horas de fermentação, a levedura começou a consumir a xilose que se extinguiu por volta das 24 horas de fermentação.

Observou-se na figura 13, como no caso da fermentação com a bactéria em meio sintético, a ausência quer de fase lag no início da fermentação, quer no término do consumo da glucose e início do consumo da xilose. Isto deve-se, possivelmente, à adaptação rápida da levedura ao meio de fermentação, visto terem sido utilizados inóculos cultivados em um meio rico com composição aproximada ao ensaio de fermentação.

No que concerne à formação de etanol, esta começou a crescer exponencialmente quando a levedura tinha consumido a quase totalidade da glucose, tendo atingido o seu valor máximo (6,58 g/L) às 30 horas de fermentação, ou seja, quando se extinguiu a xilose. Neste período a concentração de biomassa foi de 1,57 g/L. Conclui-se assim que o fim da produção de etanol se deveu à exaustão dos açúcares.

Após a exaustão das fontes de carbono e produção máxima de etanol, verificou-se o decréscimo na concentração deste produto, muito possivelmente devido ao consumo deste por parte da levedura para crescimento celular, uma vez que a biomassa da levedura foi aumentando com o decréscimo da concentração de etanol, terminando a fermentação com 2,42 g/L de biomassa e 4,84 g/L de etanol.

Analisando-se o perfil do pH ao longo do ensaio de fermentação, verifica-se que os valores obtidos estiveram aproximadamente na gama de 4,5 a 6, zona ótima para a produção máxima de etanol. Como esperado o valor mínimo (pH 4,14) foi obtido aquando do pico máximo de produção de etanol, pois na fermentação alcoólica produz-se simultaneamente uma molécula de CO₂ que baixa o pH como referido.

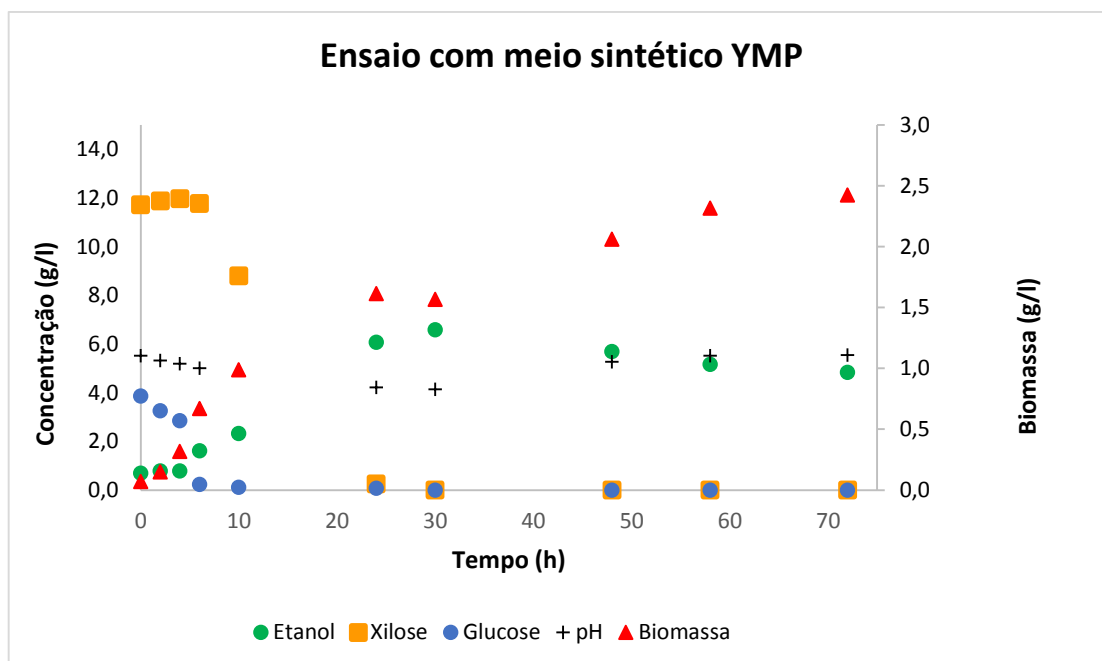


Figura 13 - Concentração de etanol, xilose, glucose, biomassa e perfil do pH ao longo do tempo de fermentação

Analisando a tabela 12 a levedura apresentou uma taxa específica de crescimento máxima, $\mu_{\text{máx}}$ de $0,38 \text{ h}^{-1}$.

As taxas volumétricas de consumo de substrato obtidas neste ensaio, a r_{glucose} , e a r_{xilose} , foram respetivamente, de $0,13 \text{ g/L}$, $0,39 \text{ g/L}$.

Assim a r_{etanol} foi de $0,20 \text{ g/L}$ tendo-se obtido um rendimento em etanol ($Y_{\text{etanol/substrato}}$) $0,38 \text{ g/g}$, correspondente a uma eficiência de conversão de $74,1 \%$, isto considerando o rendimento teórico aproximado de $0,51 \text{ g/g}$ para glucose e a xilose. Por fim o etanol máximo obtido, no presente ensaio, pela levedura *S. stipitis* CSB foi de $6,58 \text{ g/L}$, o que correspondeu a uma produtividade máxima de $0,22 \text{ g/L.h}$.

O maior $Y_{\text{etanol/substrato}}$ obtido por Krauleck *et al.* (2011) para a levedura *S. stipitis* CBS 5773, em meio mineral, foi de $0,41 \text{ g/g}$ para uma concentração inicial de xilose de 22 g/L , também em condições microaerófilas. No presente estudo obteve-se em condições microaerófilas um $Y_{\text{etanol/substrato}}$ de $0,38 \text{ g/g}$ mas para uma concentração inicial de xilose de $13,71 \text{ g/L}$, contendo ainda glucose com a concentração inicial de $3,44 \text{ g/L}$.

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos com o meio sintético YMP

| <i>Parâmetros</i> | <i>Ensaio com meio sintético YMP</i> |
|---|--|
| μ_{\max} (h^{-1}) | 0,38 |
| r_{glucose} (g/L.h) | 0,13 |
| r_{xilose} (g/L.h) | 0,39 |
| $r_{\text{arabinose}}$ (g/L.h) | - |
| r_{etanol} (g/L.h) | 0,20 |
| $Y_{\text{etanol/substrato}}$ (g/g) | 0,38 |
| $[\text{Etanol}]_{\text{máx}}$ (g/L) | 6,58 |
| Eficiência de Conversão (%) | 74,1 |
| Produtividade Máxima (g/L.h) | 0,22 |

4.3.2.2. Ensaio em Erlenmeyer com hidrolisado destoxificado com carvão ativado

Na figura 14 verificou-se que neste hidrolisado D destoxificado com carvão (tabela 8) também não existiu qualquer consumo dos substratos e respetiva formação de etanol.

Contrariamente ao ensaio com a bactéria, este ensaio com hidrolisado D apresentou, desde o início da fermentação, um perfil de pH ótimo para o funcionamento da *S. stipitis*. No entanto, ao contrário do verificado com a bactéria modificada geneticamente, esta levedura não é tolerante à presença de ácido acético. Este fato somado com a ineficácia deste método de destoxificação na remoção dos ácidos carboxílicos (4,50 g/L ácido acético presente neste hidrolisado) originou, muito possivelmente, a inatividade metabólica da levedura nesta tipologia de hidrolisado.

O estudo efetuado por Xavier *et al.* (2010) vai ao encontro da possibilidade acima referida uma vez que, verificaram o efeito da concentração do ácido acético na fermentação realizada por esta levedura. Na presença de 9,5 g/L de ácido acético, a levedura foi completamente inibida, não consumindo monossacáridos nem produzindo etanol. A uma concentração de 4,9 g/L de ácido acético (valor próximo da concentração deste estudo) apesar de ter existido algum consumo de açúcares (7,05 %) também não foi detetada a produção de etanol, evidenciando assim a necessidade de um processo de destoxificação eficaz na remoção dos inibidores, condição que não se verificou no processo de destoxificação realizado com carvão ativado alcalinamente.

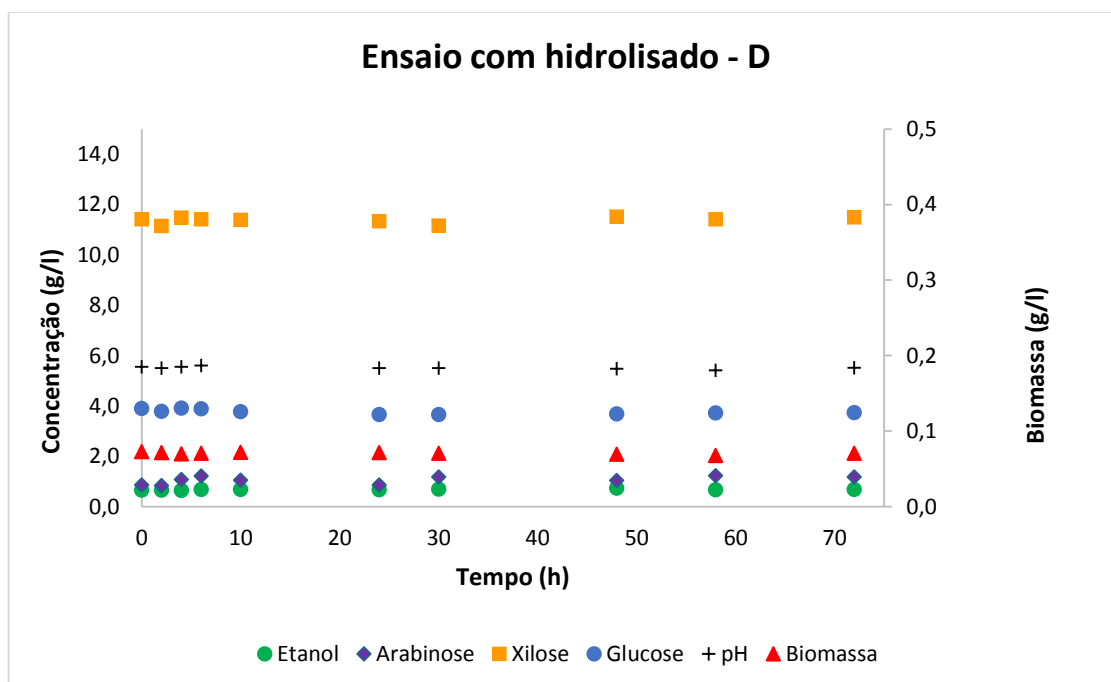


Figura 14 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, biomassa e perfil de pH ao longo da fermentação

4.3.2.3. Ensaio em Erlenmeyer com hidrolisado destoxificado por membranas

Na figura 15 visualiza-se o perfil da fermentação realizada pela levedura no hidrolisado H (tabela 9).

Verificou-se, em sentido contrário ao ensaio em meio sintético YMP, que este ensaio apresenta uma fase lag no início da fermentação. Isto deveu-se, possivelmente, à necessidade de um maior tempo, pelo menos 10 horas, para a levedura adaptar-se às condições proporcionados pelo novo meio, visto que o seu inóculo foi cultivado exclusivamente em meio rico (YMP) não tendo qualquer constituinte proveniente do hidrolisado.

O consumo da glucose só se iniciou, lentamente, por volta das 10 horas de fermentação, sendo que no ponto seguinte de medição (às 24 horas) esta fonte de carbono já se tinha esgotado. Neste ensaio a xilose foi consumida mais lentamente, verificando-

se a sua exaustão por volta das 48 horas. A levedura revelou assim um consumo dos monossacáridos mais lento no hidrolisado destoxificado por membranas do que em meio sintético YMP.

Contrariamente ao verificado no meio sintético, o valor máximo de etanol (5,27 g/L) obtido ocorreu algumas horas após a exaustão da xilose, ocorrendo por volta das 58 h, reforçando assim um metabolismo de fermentação mais lento em hidrolisado e um menor valor final de etanol formado. A concentração final de etanol (4,89 g/L) indicou, provavelmente, algum uso deste para eventual manutenção da biomassa

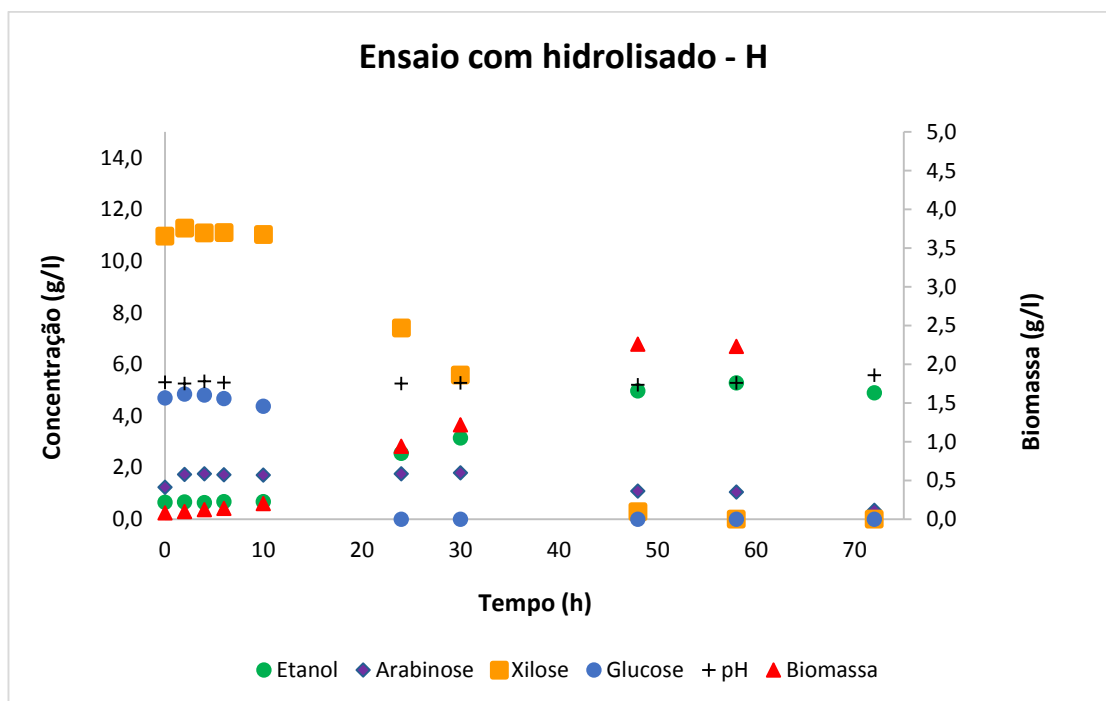


Figura 15 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, biomassa e perfil de pH ao longo do tempo de fermentação

Na tabela 13 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos para a presente fermentação. A levedura apresentou uma taxa específica de crescimento máxima de $0,10 \text{ h}^{-1}$.

As taxas volumétricas de consumo de substrato obtidas neste ensaio, a r_{glucose} , e a r_{xilose} , apresentaram valores muito aproximados sendo, respetivamente, de 0,20 e 0,19 g/L.

A taxa volumétrica de formação de etanol, r_{etanol} foi de 0,08 g/L, tendo-se obtido um rendimento em etanol ($Y_{\text{etanol/substrato}}$) de 0,28 g/g, correspondente a uma eficiência de conversão de 54,7 %, isto considerando o rendimento teórico aproximado de 0,51 g/g para a glucose, a xilose e a arabinose. Por fim o etanol máximo obtido, no presente ensaio, pela levedura *Sheffersomyces stipitis* CSB foi de 5,28 g/L, o que correspondeu a uma produtividade máxima de 0,09 g/L.h.

Tabela 13 - Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos com o hidrolisado destoxificado por membranas

| <i>Parâmetros</i> | <i>Ensaio com hidrolisado destoxificado c/ Membranas</i> |
|--|--|
| μ_{max} (h^{-1}) | 0,10 |
| r_{glucose} (g/L.h) | 0,20 |
| r_{xilose} (g/L.h) | 0,19 |
| $r_{\text{arabinose}}$ (g/L.h) | 0,01 |
| r_{etanol} (g/L.h) | 0,08 |
| $Y_{\text{etanol/substrato}}$ (g/g) | 0,28 |
| [Etanol] $_{\text{máx}}$ (g/L) | 5,28 |
| Eficiência de Conversão (%) | 54,7 |
| Produtividade Máxima (g/l.h) | 0,09 |

4.3.2.4. Ensaio em Erlenmeyer com hidrolisado não destoxificado

Na figura 15 verificou-se que o hidrolisado não destoxificado (A da tabela 8) também não apresentou resultados, tal como esperado.

Não se verificou o consumo de qualquer monossacárido e consequente metabolismo fermentativo por parte da levedura, o que provavelmente deveu-se a ter-se utilizado um hidrolisado com uma elevada concentração de compostos inibitórios. Como tal e sendo esta levedura intolerante a muitos deles como por exemplo o ácido acético, que se encontrava inicialmente com um concentração de 4,48 g/L, é natural não ter sido detetada

a produção de etanol, mostrando que esta levedura requer a destoxificação dos hidrolisados para a sua atividade metabólica.

A biomassa celular parece ter crescido embora não se tenham consumido nem a glucose nem a xilose. Eventualmente houve componentes do meio YMP, que foram responsáveis por isso ou houve interferência de algum componente do hidrolisado na absorvância ou mesmo interferência na medição da absorvância (600 nm) em função da tonalidade escura do hidrolisado obtido.

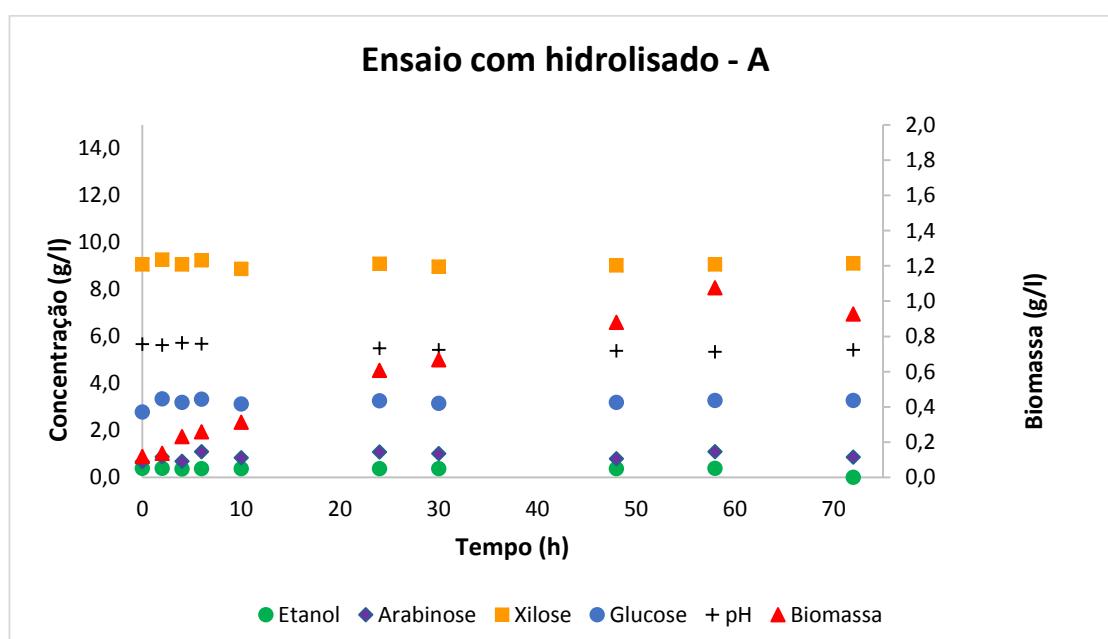


Figura 16 - Concentração de etanol, arabinose, xilose, glucose, biomassa e perfil de pH ao longo do tempo de fermentação

4.4. Comparação dos parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos nas fermentações

Na tabela 14 são apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos das fermentações, em hidrolisados, em que existiu produção de etanol, por forma a aferir-se o método mais conveniente na produção de etanol, considerando os dois microrganismos com o respetivo método destoxificante.

Verifica-se que o ensaio que proporcionou melhores resultados foi levado a cabo pela bactéria, geneticamente modificada, a partir de hidrolisado destoxificado por membranas H. De fato este apresenta um maior rendimento em etanol quando comparado com o correspondente feito com a levedura, apesar de a bactéria ter apresentado ácido acético como subproduto de fermentação e a levedura não.

Sendo as fermentações com ambos os microrganismos realizadas com as mesmas condições microaerófilas, muito possivelmente o metabolismo da bactéria favoreceu a maior produção de etanol em detrimento do metabolismo da levedura pelo que se conclui que a bactéria se apresentou mais robusta neste hidrolisado.

Em termos de comparação quantitativa entre microrganismos, a bactéria teve um acréscimo de rendimento de etanol de 0,17 $Y_{\text{etanol/substrato}}$ (g/g), uma concentração máxima de etanol superior em cerca de 2 g/L e uma eficiência de conversão dos monossacáridos em etanol sensivelmente 33% superior à levedura.

Tabela 14 - Principais parâmetros de produção de etanol obtidos nas diferentes fermentações

| Parâmetros | <i>Escherichia coli</i> MSO4 | <i>Sheffersomyces stipitis</i> CBS 5773 |
|-------------------------------------|------------------------------|---|
| | Hidrolisado Membranas | Hidrolisado Membranas |
| $Y_{\text{etanol/substrato}}$ (g/g) | 0,45 | 0,28 |
| [Etanol] _{máx} (g/L) | 7,16 | 5,28 |
| Eficiência de Conversão (%) | 88,1 | 54,7 |
| Produtividade Máxima (g/L.h) | 0,30 | 0,09 |

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a produção de etanol a partir dos hidrolisados obtidos da fração líquida resultante do pré-tratamento aplicado ao cardo. Para que isto fosse possível, fez-se um estudo no qual foram testados dois métodos diferentes de destoxificação dos hidrolisados, para posterior realização de fermentações com uma bactéria modificada e com uma levedura.

No que concerne aos hidrolisados não destoxificados, os resultados obtidos acabam por estar dentro do previsto, na medida em que devido a possuírem uma elevada concentração de inibidores condicionaram a bioconversão dos hidrolisados. Assim, pode-se concluir que não é viável fermentar a fração líquida do cardo tratado com hidrólise ácida fraca sem a aplicação de um método destoxificante.

Os resultados obtidos permitem concluir que o método de destoxificação com carvão ativado relevou-se ineficaz na remoção de alguns compostos inibidores, como os ácidos carboxílicos e consequentemente não foi possível detetar formação de etanol nas fermentações em que os hidrolisados foram destoxificados por este método.

Em sentido oposto, ambas as fermentações realizadas com hidrolisados destoxificados com membranas de nanofiltração apresentaram resultados no que concerne à produção de etanol e a bactéria apresentou um maior rendimento, comparativamente à levedura.

Em suma o hidrolisado destoxificado por membranas, concentrado com recurso a evaporador sob vácuo e fermentado pela bactéria, apresentou uma eficiência de conversão de 88% dos monossacáridos que tinham uma concentração inicial de xilose de 10,36 g/L e 3,93 g/L de glucose. Assim, neste estudo, ficou provado que o hidrolisado destoxificado por membranas e fermentado pela bactéria modificada *E. coli* mostrou ser uma possibilidade alternativa para a produção de etanol. Este etanol produzido a partir dos açúcares provenientes da fração líquida do cardo conjugado com a bioconversão de açúcares provenientes da fração sólida melhorará o rendimento global de fermentação

de açúcares do cardo, aumentando assim o potencial dos seus resíduos e subprodutos como substratos para a produção de bioetanol de 2º Geração.

6. TRABALHO FUTURO

Na perspetiva deste estudo de investigação, seria pertinente repetir-se futuramente os ensaios de fermentação com a bactéria, mas sem a adição do carbonato de cálcio, por forma a investigar-se a produção de etanol. Perspetiva-se que, mesmo sem a existência de uma solução tampão e consequente pH mais baixo, a estirpe utilizada consiga produzir etanol uma vez que é geneticamente modificada para tolerar o ácido acético.

Em termos de perspetivas futuras, deverá considerar-se a destoxificação de hidrolisados lenhocelulósicos por membrana (nanofiltração), pois ficou comprovado quantitativamente ser um método muito promissor e sem grandes custos associados.

Outro cenário interessante a investigar-se laboratorialmente será a produção de bioetanol a partir da fração líquida e da fração sólida em simultâneo. Caso seja possível encontrar-se uma metodologia a aplicar em simultâneo a ambas as frações, seria dado um passo importante para a produção de etanol a partir da elevada quantidade de biomassa gerada pelo cardo, sobretudo no Sul de Portugal.

7. BIBLIOGRAFIA

Agbogbo, F., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K. (2006) Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry*, 41, 2333-2336.

Agbogbo, F., Coward-Kelly, G. (2008). Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 30, 1515-1524.

Agbor, V., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. E Levin, D. (2011) Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29, 675-685

Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858-875.

Balat, M., Balat, H., Oz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551-573.

Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P. Negro, M., Oliva, J., Sáez, F. (2008). Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 84-91.

Bren, A., Park, J., Towbin, B., Dekel, E., Rabinowitz, J., Alon, U. (2016). Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E.coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific Reports*, 6, 24834.

Carvalho, F., Duarte, L. C., Gírio, F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 849-864.

Chandel, A., Chandrasekhar, G., Radhika, K., Radinver, R., Ravindra, P. (2011). Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6, 008-20.

Chiaramonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P., Cherchi, F. (2012). Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*, 46, 25–35.

Conde-Mejía, C., Jiménez-Gutiérrez, A., El-Halwagi, M. (2012). A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*, 3, 189–202.

Cotana, F. Cavalaglio, G., Gelosia, M., Coccia, V., Petrozzi, A., Ingles, D., Pompili, E. (2015). A comparison between SHF and SSF processes from cardoon for ethanol production. *Industrial crops and Products*, 69, 424-432.

Dahl, J., Obernberger, I. (2004, May). Evaluation of the combustion characteristics of four perennial energy crops. 2nd World Conference and Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, Rome, Italy.

Dellweg, H., Rizzi, M., Methnwe, H., Debus, D. (1984). Xylose fermentation by yeasts. 3. Comparison of *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipites*. *Biotechnology Letters*, 6, 395-400.

Demirbas, A. (2011). Competitive liquid biofuels from biomass. *Applied Energy*, 88, 17-28.

Dien, B., Cotta, M., Jeffries, T. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Institute for Microbial and Biochemical Technology*, 63, 258-266.

Dijken, J., Scheffers, A. (1987). Method for producing ethanol from xylose-containing substance. US Patent. Patent Number 4701414.

Dinwoodie, J. (1989). Wood: nature's cellular, polymeric, fibre-composite. London, Brookfield, Vt., USA.

Directiva n.º 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 08 de Maio de 2003, relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis

renováveis nos transportes. Jornal Oficial da União Europeia L 123 de 17/5/2003, pp. 42-46.

Directiva n.º 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Directivas 2001/77/CE e 2003/30/CE. Jornal Oficial da União Europeia L 140 de 5/6/2009, p. 16-62.

Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, J., Teixeira, J. (2010). Third generation biofuels from microalgae. Institute for Biotechnology and Bioengineering, University of Minho, Braga, Portugal.

Duarte, L., Esteves, M., Carvalheiro, F., Vicente, P. e Gírio, F. (2007). Os subprodutos de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa. *Engenharia Química*, 5, 56-62.

Duarte, L., Salgado, J., Torrado, I., Guerra, V., Ferreira, C., Fernandes, T., Branco, P., Carvalheiro, F., Lourenço, P. (2013). *Método para o acondicionamento e destoxificação de hidrolisados ácidos de materiais vegetais*.

European Environment Agency: *Transport at a crossroads*. Indicators tracking transport and environment in the European Union. ISSN 1725-9177, 2009.

Farias, D., Andrade, R. (2014). Kinetic modeling of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. *Applied Biochem Biotechnol*, 172, 361-379.

Fengel, D., Wegener, G. 1983. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, Walter de Gruyter & Co.

Fernandes, M., Ferro, M., Paulino, A., Mendes, J., Gravitis, J., Evtuguin, D., Xavier, A. (2015). Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. *Bioresource Technology*, 186, 309-3015.

Fernández, J., Curt, M., Aguado, P. (2006). Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Industrial Crops and Products*, 24, 22-229.

Fernández, J., Curt, M^a. (2004, May). *Low-cost biodiesel from cynara oil*. 2nd World Conference and Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, Rome, Italy.

Fernández-Sandoval, M., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martinez, B., Bustos, P., González, V., Bolivar, F., Gosset, G., Martinez, A. (2012) Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 96, 1291-1300.

Figuerola, A. (2013). *From energy Crisis to Energy Transition*. Retirado em: 15 de Maio de 2016, de: http://www.die-gdi.de/uploads/media/German-Development-Institute_Figuerola_14.10.2013.pdf.

Fu, N., Peiris, P., Markham, J., Bavor, J. (2009). A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for eficiente etanol production on glucose/xylose mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 210-217.

Galbe, M., Zacchi, G., (2012). The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 46, 70-78.

Gírio, F., Fonseca, C., Carvalheiro, F. Duarte, L., Marques, S. e Bogel-lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for the fluel etanol: A review. *Bioresource Technology*, 101, 4775-4800.

Gominho, J., Fernandez, J., Pereira, H. (2001). *Cynara cardunculus* L. - a new fibre crop for pulp and paper production. *Industrial Crops and Products*, 13, 1-10.

Gominho, J., Lourenço, A., Curt, M. Fernández, J. Pereira, H. (2014). *Cynara cardunculus* in Large Scale Cultivation. A Case Study in Portugal. *Chemical Engineering Transactions*, 37, 2283-9216.

Grammelis, P., Malliopoulou, A., Basinas. P., Danalatos, N. (2008). Cultivation and Characterization of *Cynara cardunculus* for Solid Biofuels Production in the Mediterranean Region. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1241-1258.

Gupta, R., Mehta, G., Kuhad. (2012). Fermentation of pentose and hexose sugars from corncob a low cost feedstock into ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 47, 334-341.

Ierna, A., Mauromicale. (2010). *Cynara cardunculus* L. genotypes as a crop for energy purposes in a Mediterranean environment. *Biomass and Bioenergy*, 34, 754-760.

Jeffries, T. (2008). Engineering the *Pichia stipites* genome for fermentation of hemicellulose hydrolysates. *Bioenergy*. Washigton, D.C.: ASM Press, Chp. 3.

Jimenez, M. Lagarda, G., Chavez, G., Beristain, G., Martinez, B., Carreri, J. (2012). US Patent: Patent Application 0219997 A1.

Junior, A. (2008). Bioetanol de Cana-de-Açúcar: energia para o Desenvolvimento Sustentável. 1º edição; 2º capítulo. Rio de Janeiro, Brasil.

Krahulec, S., Kratzer, R., Longus, K., Nidetzky, B. (2012). Comparison of *Scheffersomyces stipitis* strains CBS 5773 and CBS 6054 with regard to their xylose metabolism: implications for xylose fermentation. *Microbiology Open*, doi: 10.1002/mbo3.5

Kuhad, R., Gupta, R., Khasa, Y., Singh, A., Zhang, Y. (2011). Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 4950-4962.

Kukic, J., Popovic, V., Petrovic, S., Mucaji. P., Ciric. A., Stojkovic, D., Sokovic, M., (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry*, 107, 861-868.

Larsen, U. Johansen, T. Schramm, J. (2009). Ethanol as a Fuel for Road Transportation. Main Report (EFP06). Technical University of Denmark

Lewin, M., Goldestein, I. (1991). Wood Structure and Composition. New York, Marcel Dekker Inc.

Li, M.; Fan, Y.; Xu, F.; Sun, R.; (2010) Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction *Industrial Crops and Products* vol. 32 (3) p. 551-559.

Limayem A., Ricke S. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 449-467.

Mahieu, Y. (2009). *Highlights of the Panorama of Transport*. 42/2009, ISSN 1977-0316 Retirado em: 16 de Maio de 2016, de: http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-SF-09-042/EN/KS-SF-09-042-EN.PDF.

Marques, S., Alves, L., Roseiro, J., Gírio, F. (2008). Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipites*. *Biomass and Bioenergy*, 32, 400-406.

Mood, S., Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Jouzani, G., Najafi, G., Gholami, M., Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 77-93.

Moreno, A., Ibarra, D., Alvira, O., Tomás-Pejó, E., (2015). A review of biological deglinification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35, 342-354.

Muriel, C., Business highlits. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 9, 450-452. doi: 10.1002/bbb.

Mussatto, S.I.; Roberto, I.C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*, 93, 1-10.

Nguyen, N., Fargues, C., Guiga, W., Lameloise., (2015). Assessing nanofiltration and reverse osmosis for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Membrane Science*, 487, 40-50.

Nigam, J. (2000). Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipites* for ethanol production through adaption on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 208-215.

Nigam, P., Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37, 52-68.

Olah, G. (2005). Beyond Oil and Gas – The Methanol Economy, University of Southern California. 2^a ed., 44, 2636 -2639.

Oliveira, I., Gominho, J., Diberardino, S., Duarte, E. (2012). Characterization of *Cynara cardunculus* L. stalks and their suitability for biogas production. *Industrial Crops and Products*, 40, 318-323.

Palmqvist E, Hahn-Hagerbal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibitors and detoxification. *Bioresource Technology*, 74, 17-24.

REN21. (2012). Renewables 2012: Global Status Report. Paris: REN21Secretariat.

Salgado, J., Ferreira, C., Guerra, V., Torrado, I., Fernandes, T., Branco, P. C., Lourenço, P., Carvalheiro, F., DomíNquez J., Duarte, L. (2012). Simple one stage detoxification procedure using alkaly activated charcoal. 1st Iberoamerican Congress Biorefineries, Los Cabos, Baja, California, México.

Santos, J., Fernandes, M., Lourenço, P., Duarte, L., Carvalheiro, F., Crespo, J. (2011). Removal of inhibitory compounds from olive stone aoto-hydrolysis liquors by nanofiltration. *Desalination and Water Treatment*, 27, 90-96.

Sjostrom, E. (1993). Wood Chemistry: Fundamentals and Applications. Helsinki, Finland: Academic Press Limited.

Slininger, P., Thompson, S., Weber, S., Liu, Z., Moon, J. (2011) Repression of xylose-specific enzymes by etanol in *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 1801-1815.

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. (2013). Biorrefinarias e Biotecnologia Industrial. Série 2, nº 3, 1645-5878.

Vargas-Tah, A., Moss-Acosta, C., Trujillo-Martinez, B., Tiessen, A., Lozoya-Gloria, E., Orencio-Trejo, M., Gosset, G., Martinez, A. (2015) Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol. *Bioresource Technology*, 198, 611-618.

World Energy Outlook, (2013). Renewable Energy Outlook. Chapter 6-. OECD/IEA, 2013.

Xavier, A., Correia, M., Pereira, S., and Evtuguin, D. (2010) Second-generation bioethanol from eucalypt sulfite spent liquor. *Bioresource Technology*, 101, 2755-2761.

Zhang, Y., Li, M., Wang, Y., Ji, X., Zhang, L., Hou, L., (2015). Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolyzates by vacuum membrane distillation coupled with adsorption. *Bioresource Technology*, 1997, 276-283.